

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS:

CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DE UNA ZONA CONTAMINADA CON PETRÓLEO, MEDIANTE TÉCNICAS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO EN NIEVA-AMAZONAS 2016.

PRESENTADO POR:

Br. ROSITA TANYELISBETH CASTILLO ROGEL.

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: BIODIVERSIDAD Y MEJORAMIENTO
GENÉTICO.**

SUB LÍNEA: BIODIVERSIDAD Y BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL.

PIURA-PERÚ


2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

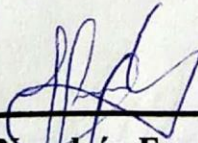
TESIS

Caracterización de la comunidad bacteriana de una zona contaminada con petróleo, mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo en Nieva-Amazonas 2016.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
BIODIVERSIDAD Y MEJORAMIENTO GENÉTICO



Br. Rosita Tanyelisbeth Castillo Rogel.
Ejecutora de la Tesis.



McBlgo. Jaime Napoleón Fernández Ponce. MSc.
Asesor de tesis.



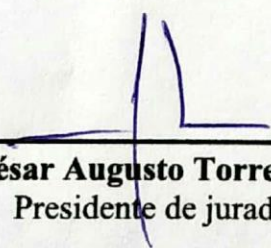
Blgo. Melitza de Lourdes Cornejo La Torre. MSc.
Co-asesor de tesis.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

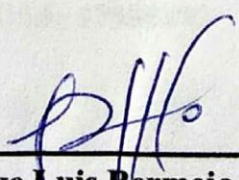
TESIS

**Caracterización de la comunidad bacteriana de una zona
contaminada con petróleo, mediante técnicas dependientes e independientes
de cultivo en Nieva-Amazonas 2016.**

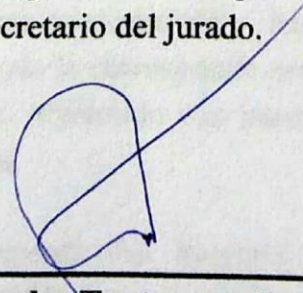
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
BIODIVERSIDAD Y MEJORAMIENTO GENÉTICO



Blgo. César Augusto Torres Díaz. Dr.
Presidente de jurado.



McBlgo. Jorge Luis Bermejo Benites.
Secretario del jurado.



Ing. Juan Carlos Tantanura Ocsas Dr.
Vocal del jurado.





DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo, **ROSITA TANYELISBETH CASTILLO ROGEL**, identificada con DNI N° **47989482**, Bachiller de la Escuela profesional de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**, de la Facultad de **CIENCIAS** y domiciliada en **CALLE SAN ISIDRO N°240 AA.HH. SANTA TERESITA**, del Distrito **SULLANA**, Provincia **SULLANA**, Departamento **PIURA**. Celular **962730601**. E-mail: **rositat.castillorogel@gmail.com**.

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada y/o realizada en el Perú o en el Extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, 30 de abril del 2019.

ROSITA TANYELISBETH CASTILLO ROGEL
DNI: 47989482

Art. 411.- El que, en un proceso administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de la libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4 inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales – RENATI
Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS



"AÑO DEL DIALOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL"

ACTA DE SUSTENTACIÓN 075-2018-D-FC-UNP

FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada "CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DE UNA ZONA CONTAMINADA CON PETRÓLEO, MEDIANTE TÉCNICAS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO EN NIEVA - AMAZONAS 2016" presentada por la señorita Bachiller **ROSITA TANYELISBETH CASTILLO ROGEL**, con el asesoramiento del **MSc. Jaime Napoleón Fernández Ponce** y Co-asesor **Blgo. Melitza de Lourdes Cornejo La Torre, M.Sc.**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, lo declaran:

APROBADA (X)

DESAPROBADA ()

Con la mención de:

SOBRESALIENTE

(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIOLÓGO**.

(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIOLÓGO**; después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 20 diciembre del 2018.

[Signature]
McBlgo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, M.Sc.
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

[Signature]
McBlgo. JORGE LUIS BERMEJO BENITES
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

[Signature]
Dr. JUAN CARLOS TANTARUNA OCSAS
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla



Scanned with
CamScanner

DEDICATORIA:

Al angelito que robó mi corazón, mi amado hermanito, Evan; a mis padres Margarita y Segundo por el inmenso amor, apoyo y comprensión que me entregan a diario y a mi hermanita por sus oraciones y amor brindado a pesar de la distancia.

A Francis, mi compañero en el desarrollo de esta investigación, por su apoyo en campo y laboratorio, por el cariño y enseñanzas brindadas desde que llegué a la familia de Inca Bio'tec.

También a todas aquellas comunidades nativas que se ven afectadas por los derrames de hidrocarburos, la contaminación y destrucción de sus ecosistemas y que luchan por hacer respetar a la madre Tierra.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios, quien me permitió culminar este trabajo, dándome las fuerzas y voluntad suficiente para llegar al final de esta meta, sin Él no hubiera logrado nada.

De sobre manera y muy complacidamente a la Universidad Nacional de Piura, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y a sus distinguidos docentes por cultivar en mi el amor a la ciencia e investigación.

A mi asesor y co-asesora por la confianza, ayuda profesional y tiempo brindado, a Eric Mialhe, por la oportunidad que se me dio de ingresar al equipo de Biotecnología ambiental de la empresa Inca Bio'tec para el desarrollo de esta investigación.

A la municipalidad de Condorcanqui en Nieva, por su amabilidad, orientación y además a aquellas personas de Uchichiangos que nos permitieron ingresar a la zona del derrame.

A mis amigos y en especial a mi hermana de corazón Meryuri, por sus ánimos y apoyo moral que han tenido hacia mí y a todo aquel que de una u otra forma colaboró con su granito de arena a la culminación de este proyecto.

RESUMEN

En zonas contaminadas con hidrocarburos, existen microorganismos capaces de sobrevivir a tales condiciones y es importante estudiarlos para la biorremediación. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente el perfil de la comunidad bacteriana de zonas contaminadas con hidrocarburos en la provincia de Nieva, Amazonas, Perú. El análisis dependiente de cultivo permitió aislar a partir de muestras de agua y suelo los géneros: *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Acinetobacter* identificados por secuenciamiento parcial del gen 16S ARNr; y análisis de datos en BLAST de NCBI. El análisis independiente de cultivo se basó en la secuenciación de próxima generación de Illumina dirigida al gen 16S ARNr a partir del ADN metagenómico extraído de aguas y suelos contaminados y no contaminados con hidrocarburos seguido de un análisis de datos en el software QUIIME 1.9.1; mostrando una composición de la comunidad bacteriana de 140 Unidades operacionales taxonómicas (OTU's) asignados a diferentes géneros en suelo muy contaminado, 163 en suelo poco contaminado, 160 en suelo no contaminado, 159 en agua contaminada y 181 en agua no contaminada; algunos géneros fueron identificados como biomarcadores de contaminación por su alta prevalencia en muestras contaminadas como *Acinetobacter* en suelo y *Pseudomonas* en agua. Por metagenómica se encontraron bacterias cultivables muy abundantes que no lograron ser aisladas y bacterias aisladas que mostraron prevalencia muy baja por análisis metagenómico mostrando la complementariedad de las técnicas no solo para la caracterización de las comunidades microbianas, sino también para el monitoreo espacio temporal de áreas en estudio o experimentales.

Palabras clave: Metagenómica; hidrocarburos, bacterias, caracterización molecular.

ABSTRACT

In areas contaminated with hydrocarbons, there are microorganisms capable of surviving such conditions and it is important to study them for bioremediation. The objective of this work was to molecularly characterize the profile of the bacterial community of areas contaminated with hydrocarbons in the province of Nieva, Amazonas, Peru. The culture dependent analysis allowed to isolate from genus water and soil samples: *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Acinetobacter* identified by partial sequencing of the 16S rRNA gene; and data analysis in BLAST from NCBI. The independent culture analysis was based on the next generation sequencing of Illumina directed to the 16S rRNA gene from the metagenomic DNA extracted from contaminated waters and soils not contaminated with hydrocarbons followed by a data analysis in the software QUIIME 1.9.1; showing a composition of the bacterial community of 140 taxonomic operational units (OTUs) assigned to different genera in heavily contaminated soil, 163 in low-contaminated soil, 160 in uncontaminated soil, 159 in contaminated water and 181 in uncontaminated water; some genera were identified as biomarkers of contamination due to their high prevalence in contaminated samples such as *Acinetobacter* in soil and *Pseudomonas* in water. Due to metagenomics, very abundant culturable bacteria were found that could not be isolated and isolated bacteria that showed very low prevalence by metagenomic analysis showing the complementarity of the techniques not only for the characterization of the microbial communities, but also for the temporal space monitoring of areas in study or experimental.

Keywords: Metagenomics; hydrocarbons, bacteria, molecular characterization

ÍNDICE

DEDICATORIA:	vi
AGRADECIMIENTOS	viii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE	1
INDICE DE TABLAS	3
INDICE DE GRÁFICOS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
I. INTRODUCCIÓN:	6
II. MATERIAL Y MÉTODOS	11
2.1. Ubicación:	11
2.2. Obtención de las muestras:	11
2.3. Caracterización mediante técnicas dependientes de cultivo de zonas contaminadas con hidrocarburos de petróleo:	13
2.4. Caracterización mediante técnicas independientes de cultivo de la estructura bacteriana de zonas contaminadas y no contaminadas con hidrocarburos de petróleo:	16
III. RESULTADOS:	20

3.1. Caracterización mediante técnicas dependientes de cultivo de zonas contaminadas con hidrocarburos de petróleo:	20
3.2. Caracterización mediante técnicas independientes de cultivo de la estructura bacteriana de zonas contaminadas y no contaminadas con hidrocarburos de petróleo:	22
3.3. Análisis Comparativo de las comunidades bacterianas en las muestras	34
IV. DISCUSIÓN	38
V. CONCLUSIONES	43
VI. RECOMENDACIONES	444
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	455
VIII. ANEXOS	54
8.1. Tablas complementarias de los resultados	54
8.2. Muestreo	59
8.3. Aislamiento de cepas bacterianas	60
8.4. Genómica	61
8.5. PCR y Electroforesis	62
8.6. Bioinformática	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Lista de cepas bacterianas aisladas a partir de suelo contaminado con petróleo.....	20
Tabla 3.2. Lista de cepas bacterianas aisladas a partir de agua contaminado con petróleo.....	21
Tabla 3.3. Lista de cepas bacterianas aisladas a partir de petróleo derramado colectado del suelo.....	21
Tabla 3.4. Resumen de datos de las secuencias encontradas en el secuenciamiento de próxima generación.....	23
Tabla 3.12. Géneros bacterianos no comunes en las muestras de suelo.....	39
Tabla 8.1.1. Abundancia relativa de filos bacterianos (mayores al 1%) en muestras de suelo.....	54
Tabla 8.1.2. Abundancia relativa de géneros bacterianos (mayores al 1%) en muestras de suelo.....	55
Tabla 8.1.3. Abundancia relativa de géneros no cultivable (mayores al 1%) en muestras de suelo.....	56
Tabla 8.1.4. Abundancia relativa de filos bacterianos (mayores al 1%) en muestras de agua.....	57
Tabla 8.1.5. Abundancia relativa de géneros (mayores al 1%) presentes en muestras de agua.....	58
Tabla 8.1.6. Bacterias no cultivables mayores al 1% de abundancia presentes en muestras de agua.. ..	57

INDICE DE GRÁFICOS

Figura 3.1. Abundancia relativa de filos bacterianos (mayores al 1%) en muestras de suelo.....	25
Figura 3.2. Abundancia relativa de géneros bacterianos cultivables (mayores al 1%) en muestras de suelo.....	28
Figura 3.3. Abundancia relativa de géneros bacterianos no cultivables (mayores al 1%) en muestras de suelo.....	31
Figura 3.4. Abundancia relativa de filos bacterianos (mayores al 1%) en muestras de agua.....	33
Figura 3.5. Abundancia relativa de géneros (mayores al 1%) presentes en muestras de agua.....	35
Figura 3.6. Abundancia relativa de géneros bacterianos no cultivables mayores al 1% presentes en muestras de agua.....	36
Figura 3.7. Índice de Shannon.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Diagrama de flujo del análisis del metagenoma de una muestra de suelo en laboratorio.....	9
Figura 2.2. Ubicación de la zona del derrame, vista desde el programa Google Earth.....	11
Figura 2.3. Zona de muestreo, sub zonas delimitadas y puntos específicos de los cuáles se obtuvieron las muestras.....	12
Figura 2.4. Agar con petróleo como suplemento para siembra de inóculos.....	13
Figura 2.5. Obtención de colonias separadas.....	14
Figura 2.6. Tubos <i>Power Bead</i> con las muestras a trabajar.....	17
Figura 2.7. Kit Power Soil DNA Isolation Kit.....	18
Figura 3.8. Amplificación del gen 16S ARNr.....	22
Figura 3.9. Diagrama de Venn de géneros bacterianos presentes en muestras de suelo.....	38
Figura 3.10. Diagrama de Venn detallado de géneros bacterianos presentes en muestras de suelo.....	38
Figura 3.11. Diagrama de venn a nivel de género de muestras de agua contaminada y no contaminada.....	41
Figura 3.12. Diagrama de venn detallado a nivel de género de muestras de agua contaminada y no contaminada.....	41

I. INTRODUCCIÓN:

La alta demanda energética en el mundo moderno ha determinado el uso intensivo del petróleo y sus derivados como su principal fuente. Muchos de sus componentes son empleados como materias primas básicas en las industrias químicas y petroquímicas. (Benavides et al., 2006) llevando a la liberación masiva de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, lo que hace de estos compuestos algunos de los contaminantes ambientales más ubicuos de la Tierra (Eckle et al., 2012); por ejemplo, mediante derrames accidentales desde buques petroleros, extracción, y procesamiento del petróleo y sus derivados, etc (Benavides et al., 2006). En Perú se registran derrames de petróleo desde 1978 (Escalante, 2002).

La composición química del crudo se puede clasificar en fracciones principales de alifáticos, aromáticos, asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas) y resinas (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos y amidas) (Kumar et al., 2014). Las fracciones principales de hidrocarburos alifáticos consisten en n-alcanos fácilmente biodegradables, alcanos ramificados menos biodegradables y alcanos cíclicos (Das y Chandran, 2011). Los hidrocarburos aromáticos son aquellos hidrocarburos que poseen las propiedades especiales asociadas con el núcleo o anillo del benceno, en el cual hay seis grupos de carbono-hidrógeno unidos a cada uno de los vértices de un hexágono, sus derivados son compuestos cuyas moléculas están formadas por una o más estructuras de anillo estables, (INSSBT) los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de compuestos químicos con dos o más anillos aromáticos y son los componentes más recalcitrantes del petróleo crudo presente en un alto porcentaje de composición (Kanaly y Harayama, 2000; Haritash y Kaushik, 2009);por lo tanto, es un producto de desecho potencialmente peligroso (Baheri, 2001)

Desde un punto de vista ambiental, las bacterias son muy importantes, pues tienen la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos a sustancias inocuas, que pueden ser reciclados al medio ambiente (Rittmann, 2001). Se estima que, de todos los microorganismos presentes en el suelo, las bacterias son aquellas que se presentan en un mayor número y también las más importantes en la degradación de hidrocarburos (Sarubbi, 2000).

El análisis de poblaciones microbianas dentro de comunidades naturales ha tenido ciertas limitaciones debido al uso de métodos tradicionales de cultivo. Estas limitaciones se han asociado a la dificultad de reproducir en el laboratorio las condiciones naturales en las cuales se desarrollan las comunidades microbianas (Stams et al., 2006). A pesar de estas limitaciones, el aislamiento de microorganismos propios de ambientes naturales sigue siendo una herramienta útil para el estudio de la fisiología, bioquímica y genética microbiana (Ben-Dov et al., 2009).

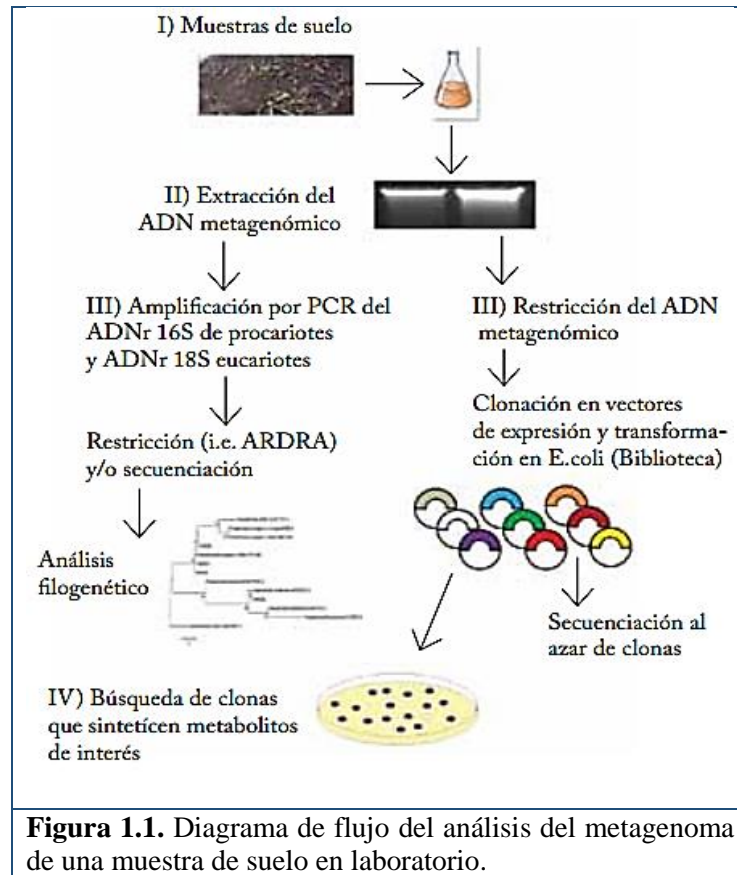
Para la caracterización de estas bacterias cultivables, una de las técnicas más usadas desde hace algunas décadas es la amplificación de los genes ribosomales que codifican para la subunidad 16S (ADNr 16S). Este marcador es una poderosa herramienta que ha sido ampliamente usada en clasificaciones filogenéticas, debido a que su secuencia es altamente conservada (Hernandez et al., 2010). Se ha demostrado que la secuencia del 16S ARNr tiene un alto grado de resolución a un nivel taxonómico superior al de especie (Rosselló y Amann, 2001).

Está bien establecido que solo aproximadamente el 1% de las bacterias en la Tierra pueden

cultivarse fácilmente *in vitro*, la llamada 'gran anomalía del recuento de placas', basada en la observación de que los recuentos microscópicos son considerablemente mayores que los recuentos viables totales equivalentes (Vartoukian et al., 2010). Actualmente se estima que hay 61 filos distintos de bacterias, de los cuales 31 no tienen representantes cultivables (Hugenholtz et al., 2009).

Una probable explicación es el desconocimiento de sus requerimientos nutricionales y fisiológicos para su crecimiento. Este hecho ha limitado enormemente nuestro conocimiento sobre la diversidad bacteriana. Para contrarrestar esta limitante, se han desarrollado métodos para poder aislar y amplificar el material genético de bacterias no cultivables en diferentes ambientes; la metagenómica, así como las nuevas oportunidades biotecnológicas que surgen con esta nueva ciencia (Hernandez et al., 2010).

La metagenómica es una ciencia que surge como una rama de las ciencias genómicas, la cual se refiere al estudio del metagenoma de un nicho en particular (Handelsman, 2004). El metagenoma se puede definir como el total de ADN de una muestra ambiental. En la Figura 1.1 se muestra un ejemplo de un estudio metagenómico con una estrategia general y siguiendo los pasos básicos en la investigación: (I) Se colecta la muestra de interés; (II) se aísla el ADN metagenómico; (III) el metagenoma puede tomar tres vías: a) aislamiento por PCR de los 16S para conocer la diversidad bacteriana (o de otras divisiones como arqueas o eucariontes) del metagenoma, b) digestión y clonación en vectores de expresión, y/o c) secuenciación directa de la muestra. En el paso final, (IV) se analizan los clones en busca de actividades de interés (Hernandez et al., 2010).



Durante los últimos treinta años, el desarrollo de herramientas moleculares independientes del cultivo de microorganismos ha permitido incrementar nuestro conocimiento sobre la diversidad microbiana presente en nuestro Planeta. Este abordaje permite acceder al potencial genético contenido en una comunidad microbiana de forma mucho más completa revolucionando nuestra visión de la ecología microbiana, revelando comunidades hiperdiversas que son extremadamente sensibles a los contaminantes de hidrocarburos en una variedad de entornos (Vartoukian et al., 2010)

Aunque los métodos dependientes de cultivo en general, recuperan una pequeña porción de la diversidad del medio ambiente del suelo, todavía son un componente crítico en el desarrollo de las investigaciones (Chaerun et al., 2004) Ambas estrategias (dependientes e independientes de cultivo) se complementan entre sí.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente mediante el gen 16S ARNr el perfil de la comunidad microbiana asociada a zonas contaminados con Hidrocarburos de Petróleo en la Provincia de Nieva – Amazonas, para ello se utilizaron técnicas dependientes e independientes de cultivo mediante el análisis de secuenciamiento de próxima generación (The Next Generation Sequencing).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Ubicación:

El trabajo se realizó en la zona de derrame de petróleo crudo en la Selva peruana, a la altura del Km 364 +900 de la Quebrada de Uchichiangos en el tramo II del oleoducto norperuano, distrito de Nieva – Provincia de Condorcanqui, Región Amazonas. Las coordenadas de la zona son $04^{\circ}35'54.0''S$ y $77^{\circ}52'06.1''W$, a una altura de 243 m.s.n.m. al lado de la quebrada mencionada (Figura 2.2).

Así mismo, el desarrollo experimental tuvo lugar en los laboratorios de la empresa de Investigación Inca` Biotec S.A.C. – Tumbes



Figura 2.2. Ubicación de la zona del derrame, vista desde el programa Google Earth.

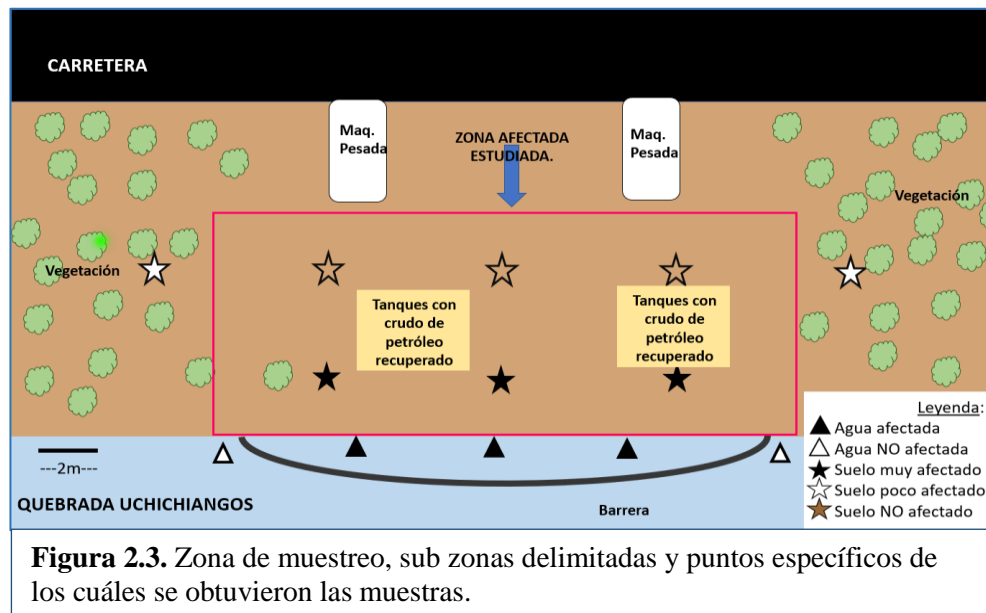
2.2. Obtención de las muestras:

Se realizó un muestreo intencional o de conveniencia a favor de la información que nos puedan brindar las muestras, siguiendo la normativa establecida en el reglamento de la guía de muestreo de suelos del Ministerio del Ambiente en el marco del D.S. N°002-2013-MINAM (Ministerio del Ambiente, 2013) (Anexo 8.1) estándares de calidad ambiental para suelos del año 2013 y considerando metodología de Derrosi (2014):

Dicho muestreo consistió en la toma de muestra de cuatro zonas de interés:

- Suelo contaminado
 - Muy impactado y cerca de la zona de derrame.
 - Poco impactado y más alejado de la zona de derrame.
- Suelo No Contaminado (Suelo prístino)
- Agua contaminada (Agua fuera de la barrera de contención)
- Agua No contaminada (Agua dentro de la barrera de contención)

De cada zona elegida, se obtuvieron tres muestras de 350 g o ml aproximadamente cada una (con excepción de las muestras de suelo y agua no contaminada, que se obtuvieron sólo dos muestras de 500 g o ml aproximadamente cada una), tal como se muestra en la figura 2.3.



La recolección de las muestras de suelo se realizó con paletas estériles plásticas obteniendo suelo superficial hasta 10 cm de profundidad y se almacenaron en frascos de boca ancha (anexo 8.1), cubiertos de la luz solar y guardados a 4°C, cuidando de no romper la cadena de frío hasta su análisis y para el caso de las muestras de agua fue directamente colectada en los frascos boca ancha cubiertos de la luz solar.

2.3. Caracterización mediante técnicas dependientes de cultivo de zonas contaminadas con hidrocarburos de petróleo:

a) Aislamiento de cepas bacterianas:

Se realizó en medios de cultivo microbiológico suplementados con petróleo crudo, empleando diluciones sucesivas y considerando metodologías de Tuo (2012) y Samanez (2008): Para aislar bacterias del suelo, se realizó un pre-tratamiento el cual consistió en suspender 10 g de la muestra en 100 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85% en un matraz estéril y se mantuvo en agitación constante a 180 rpm durante 24 horas.

Para aislar bacterias de suelo y agua: se sembraron 10 ml de agua o del sobrenadante del paso anterior en medio de pre-enriquecimiento. El medio de pre-enriquecimiento fue Caldo Luria Bertani 90 ml, y suplementado con 1mL de petróleo crudo estéril de la zona del derrame. Se incubó a temperatura ambiente en agitación constante durante seis a siete días (el procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra). Cumplido el tiempo, se dejó reposar por una hora las muestras para recuperar el sobrenadante y sembrar por esparcimiento (100 ul), utilizando la técnica de diluciones seriadas (10^{-7} , 10^{-9} y 10^{-12}), en agar de medio mínimo salino MSM a pH 6.0, enriquecido con 1ml de petróleo estéril esparcido como se muestra en la figura 2.4 e incubando (temperatura ambiente) durante 24 horas, con revisión constante.

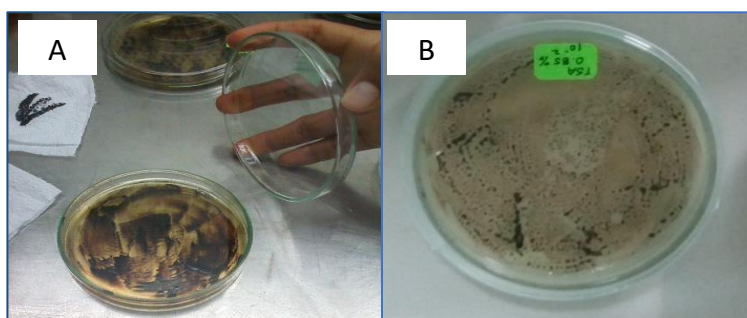


Figura 2.4. A) Agar con petróleo como suplemento para siembra de inóculos. B) Placa sembrada con el inóculo y petróleo después de 12 horas de incubación.

Se eligieron las colonias diferentes por forma, color y tamaño, y se sembraron por estrías por agotamiento en agar triptosa de soya (TSA) y luego, se realizaron las purificaciones necesarias hasta que se obtuvieron colonias separadas como indica la figura 2.5:



Figura 2.5. Obtención de colonias separadas.

Posteriormente, con un asa de kolle cada cepa bacteriana aislada de cada placa se sembró en un microtubo con 1ml de caldo LB para luego ser incubados a temperatura ambiente por 24 horas. Finalmente se comprobó su pureza con una tinción Gram y se conservaron a -20°C y con el 15% de glicerol como crioprotector.

b) Extracción de ADN genómico bacteriano:

Previo a la extracción las cepas conservadas se reactivaron 100 μ l del inóculo en 900 μ l de caldo nutritivo para la obtención de cultivos jóvenes y posteriormente se realizó la extracción siguiendo el protocolo de CTAB 2X de Worden Lab Prepared (Worden, 2009):

Se centrifugaron los tubos que contienen el cultivo bacteriano a 12000 rpm por 5 min, descartando el sobrenadante. Luego, el buffer CTAB pre-calentado a 60°C se agregó (695 μ l) al microtubo con el pellet; se añadieron 1.4 μ l de β -Mercaptoetanol (0.2%) y

3.5 µl de proteinasa K (0.1 mg/ml) y se pusieron a incubar a 60°C por 1 hora; cumplido el tiempo se mezcló suavemente invirtiendo el microtubo de vez en cuando y agregando después 700µl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) para mezclar nuevamente por inversión suavemente por 2 minutos. Dicha mezcla se llevó a centrifugar por 10 minutos a 14000 x g a 4°C y se recuperó el sobrenadante a un nuevo tubo para luego agregar isopropanol (2/3 del volumen recuperado). Se mezcló por inversión los tubos suavemente e incubó a -20°C por 2 horas, cumplido el tiempo se centrifugó por 15 minutos a 14000 x g a 4°C, se descartó el sobrenadante y se agregó 400µl de etanol al 75%. Se centrifugó después por 10 minutos a 14000 x g a 4°C y descartado el sobrenadante y se puso a secar el pellet; que después fue resuspendido en 50µl de TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl-1 mM EDTA) con agregar 1µl de RNAsa (10mg/ml) e incubado por 30 minutos a 37°C ó 65°C por 15 minutos. Se puede observar la pureza por la medición de OD en un espectrofotómetro (Relación A260/A280nm).

El ADN genómico extraído se almacenó a -20°C, previamente verificada la calidad de la banda en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (90 voltios por 30 minutos) y fotodocumentada la vista en un transluminador de luz uv (302nm).

c) Amplificación del gen 16S ARNr mediante Reacción de la polimerasa en cadena (PCR):

Se preparó un mix de reactivos con los volúmenes estandarizados para amplificación por PCR de ADN bacteriano de la empresa INCA BIO´TEC S.A.C. (ver anexo 8.5) y se alicuotaron 24 ul del mix más 1ul de muestra de ADN de cada cepa bacteriana para llevarlos al termociclador, el cual fue programado con una temperatura de

desnaturalización previa de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, alineamiento a 58°C por 90 segundos y elongación a 72°C por 50 segundos, una paso final de elongación adicional a 72°C por 1 minuto y almacenamiento a 4°C. Se emplearon los juegos de iniciadores universales para el gen16S ARNr 27F *Forward* AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 1492R *Reverse* TACGGYTACCTTGTTACGACTT. La calidad de la amplificación se validó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (90 voltios por 30 minutos) y fotodocumentada en un transiluminador de luz UV.

Los amplicones, finalmente fueron enviados a secuenciar a la empresa *Macrogen* USA. Las secuencias obtenidas fueron editadas empleando el software *Mega 7* y se confirmó su identidad por solapamiento de secuencias forward y reverse en el programa *DNA Dragon* y finalmente comparación de la secuencia con la base de datos del servidor BLASTN de NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

2.4. Caracterización mediante técnicas independientes de cultivo de la estructura bacteriana de zonas contaminadas y no contaminadas con hidrocarburos de petróleo:

a) Extracción de ADN metagenómico:

Para muestras de agua y suelo se trabajó a partir de un *pool* de muestra (mezcla de las 3 submuestras de cada punto), haciendo uso del *kit Power Soil DNA Isolation* para extracción de ADN metagenómico siguiendo el protocolo del fabricante, Mo Bio Laboratories, USA:

Se agregaron 5gr de cada *pool* en los tubos *Power Bead* (Figura 2.6) y luego de *vortexear* suavemente la muestra hasta que quedó homogénea fueron agregados 60 ul de la solución C1 e invertidos varias veces para luego ser *vortexeados* vigorosamente por 10 minutos y llevados a la centrifugar a 10 000 rpm por 30 segundos. Se transfirió el sobrenadante (entre 400-500 ul) a los tubos de 2mL *Collection tube*, y luego se agregaron 250 ul de la solución C2, y se *vortexeó* por 5 segundos luego se incubaron a 4°C por 5 minutos. Cumplido el tiempo, se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente a 10 000rpm por un minuto y luego se transfirieron 600 ul del sobrenadante a los tubos de 2mL *Collection tube*, tratando de no llevar restos de pellet para poder agregar luego 200 ul de la solución C3, se *vortexeó* y luego a incubación a 4°C por 5 minutos.



Figura 2.6. Tubos *Power Bead* con las muestras a trabajar.

Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente a 10 000 revoluciones por un minuto, y se recuperó (600 a 750 ul) del sobrenadante a los tubos de 2mL *Collection tube*, luego se agregaron (960 a 1200 ul) de la solución C4 al sobrenadante y se llevó a *vortexear* por 5 segundos. Se filtró la mezcla dentro de los *spin filter*, (este proceso se realizó cargando un aproximado de 700 ul de la mezcla dentro de los *spin filter*, se centrifugó a temperatura ambiente a 10 000rpm por

un minuto eliminando el filtrado varias veces hasta filtrar toda la muestra en el *spin filter*), luego se agregaron 500 ul de la solución C5 al *spin filter*, y se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente a 10 000 rpm por 30 segundos descartando lo filtrado.

Nuevamente se llevaron a centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10 000 rpm por un minuto, se descartó lo filtrado, y se transfirió el *spin filter* a un nuevo *Collection tube* de 2mL para luego agregar 100 ul de la solución C6 y posteriormente se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente a 10 000rpm por 30 segundos.



Figura 2.7. Kit Power Soil DNA Isolation Kit.

Se descartó el *Spin filter* para almacenar luego el ADN genómico extraído a -20°C, previamente verificada la calidad de la banda en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (90 voltios por 30 minutos), se fotodocumentó la vista en un transluminador de luz UV y se comprobó la existencia del gen 16S ARNr mediante una amplificación por PCR de este mismo gen.

Finalmente, se envió el DNA metagenómico a la empresa Mr DNA en Estados Unidos

para que mediante la tecnología Ion Torrent PMG, realice el secuenciamiento *The Next Generation Sequencing*. Finalmente se analizaron estos resultados haciendo uso de diversos softwares bioinformáticos disponibles en línea (Binning, Mothur y Qiime 1.9.1).

III. RESULTADOS:

3.1. Caracterización mediante técnicas dependientes de cultivo de zonas contaminadas con hidrocarburos de petróleo:

Se logró amplificar parcialmente una región del gen 16S ARNr de 13 cepas bacterianas aisladas, seis a partir de muestras de suelo y 7 a partir de muestras de agua. Obteniendo los géneros *Pseudomonas*, *Proteus*, *Morganella* y *Serratia* de las muestras de suelo y *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetibacter* y *Proteus* de aguas contaminadas.

En las tablas 3.1 y 3.2 se muestran los nombres de las cepas identificadas a partir de muestras de suelo y agua respectivamente, así como código de la cepa, porcentaje de identidad de su secuencia en el análisis bioinformático y Número de acceso en la base de datos de BLAST para obtener información adicional sobre cada una de ellas.

Tabla 3.1. Lista de cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de suelo contaminado con petróleo.			
Código	Especie	Identidad	Número de acceso
S1	<i>Pseudomonas moraviensis</i> strain 1B4	98%	NR_043314.1
S2	<i>Proteus hauseri</i> strain DSM 14437	97%	NR_104767.1
S3	<i>Proteus vulgaris</i> strain ATCC 29905	97%	NR_115878.1
S4	<i>Proteus terrae</i> strain N5/687	99%	NR_146019.1
S5	<i>Morganella morganii</i> strain NBRC 3848	99%	NR_113580.1
S6	<i>Serratia marcescens</i> subsp. sakuensis strain KRED	98%	NR_036886.1

Tabla 3.2. Lista de cepas bacterianas aisladas a partir de agua contaminado con petróleo.			
Código	Especie	Identidad	Número de accesión
A1	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain JCM1665	96%	NR_112010.1
A2	<i>Enterobacter cloacae</i> strain ATCC	99%	NR_112010.2
A3	<i>Pseudomonas koreensis</i> strain Ps 9-14	95%	NR_112010.3
A4	<i>Serratia marcescens</i> subsp. sakuensis strain KRED	99%	NR_112010.4
A5	<i>Pseudomonas prosekii</i> strain AN/28/1	93%	NR_112010.5
A6	<i>Acinetobacter rudis</i> strain G30	97%	NR_112010.6
A7	<i>Proteus vulgaris</i> strain ATCC	98%	NR_112010.7

Así mismo se muestra en la tabla 3.3 una lista de cepas que se aislaron a partir del petróleo derramado y que fue colectado también.

Tabla 3.3. Lista de cepas bacterianas aisladas a partir de petróleo derramado colectado del suelo.			
Código	Especie	Identidad	Número de accesión
P1	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain JCM1665	98%	NR_112010.1
P2	<i>Enterobacter cloacae</i> strain ATCC 13047	95%	NR_102794.2
P3	<i>Serratia marcescens</i> strain NBRC 102204	95%	NR_114043.1
P4	<i>Serratia marcescens</i> strain NBRC 102204	99%	NR_114043.1
P5	<i>Serratia nematodiphila</i> strain DZ0503SBS1	98%	NR_044385.1
P6	<i>Enterobacter soli</i> strain LF7	97%	NR_117547.1

La figura 3.8 muestra la fotodocumentación de las bandas de los amplicones de las cepas bacterianas y sus respectivos controles migrados en un gel de agarosa al 1.5% y empleando un marcador de peso molecular de ADN de 100 pb de la marca *Thermo Scientific*.

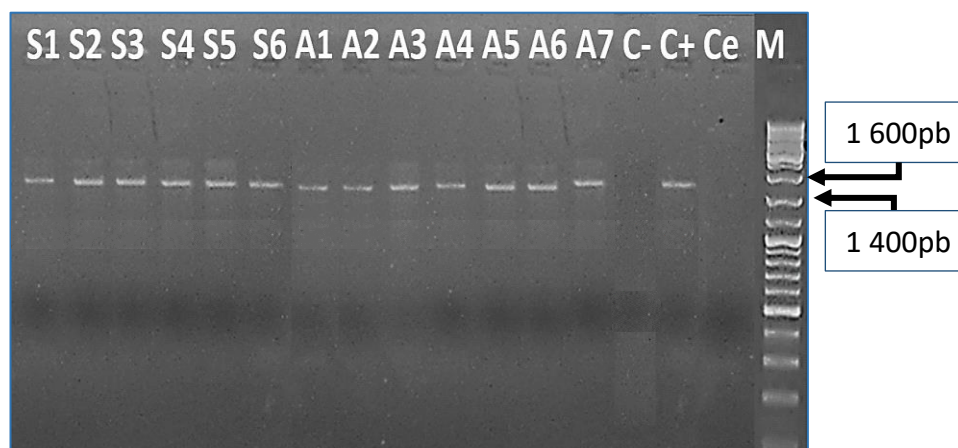


Figura 3.8. Amplificación del gen 16S ARNr. Líneas 1) Marcador de 100 pb; 2) Control negativo; 3) Control positivo 4-11) Amplicones de la secuencia del gen 16S ARNr bacteriano amplificado con los primers con primers 27F y 1492R.

3.2. Caracterización mediante técnicas independientes de cultivo de la estructura bacteriana de zonas contaminadas y no contaminadas con hidrocarburos de petróleo:

Mediante el análisis metagenómico se lograron obtener un total de 71354 secuencias de ADN de las cuales sólo se trabajó con aquellas de alta calidad. En la tabla 3.4 se muestran los detalles de la metadata obtenida en cada muestra:

- Las secuencias brutas muestran el total de secuencias obtenidas por el secuenciador de próxima generación SBS de Illumina.

- Las secuencias $Q > 30$ son aquellas con un puntaje de calidad mayor a 30 (lo que equivale a una probabilidad de que la secuencia sea correcta en un 99.9%) este resultado se obtiene a partir del logaritmo de probabilidad de errores, el cual es $Q = -10 \log_{10} P$.
- Secuencias en OTU's son aquellas a las que se les ha asignado una unidad taxonómica.
- Secuencias en OTU's $> 0.1\%$ son a las que se les ha asignado una unidad taxonómica y tienen una abundancia relativa mayor al 0.1%.
- Porcentaje (%) de asignación a OTU's del total de secuencias, muestra el porcentaje de estas a las que se les asigno una unidad taxonómica operacional.
- Longitud muestra la longitud promedio en pares de base de las secuencias asignadas a un OTU.

Tabla 3.4. Resumen de datos de las secuencias encontradas en el secuenciamiento de próxima generación.

Muestras	Secuencias Brutas	Secuencias $Q > 30$	Secuencias en Otus	Secuencias en Otus $> 0.1\%$	% Asignación a Otus	Longitud
Suelo muy contaminado	25,799	25,164	23,304	17,145	90.33	254 pb
Suelo poco contaminado	25,048	24,412	23,024	10,210	91.92	255 pb
Suelo no contaminado	20,507	19,946	18,676	7,304	91.07	255 pb
Agua contaminada	77,559	75,629	69,179	52,795	89.20	255 pb
Agua No contaminada	67,066	65,444	58,000	49,967	86.48	255 pb

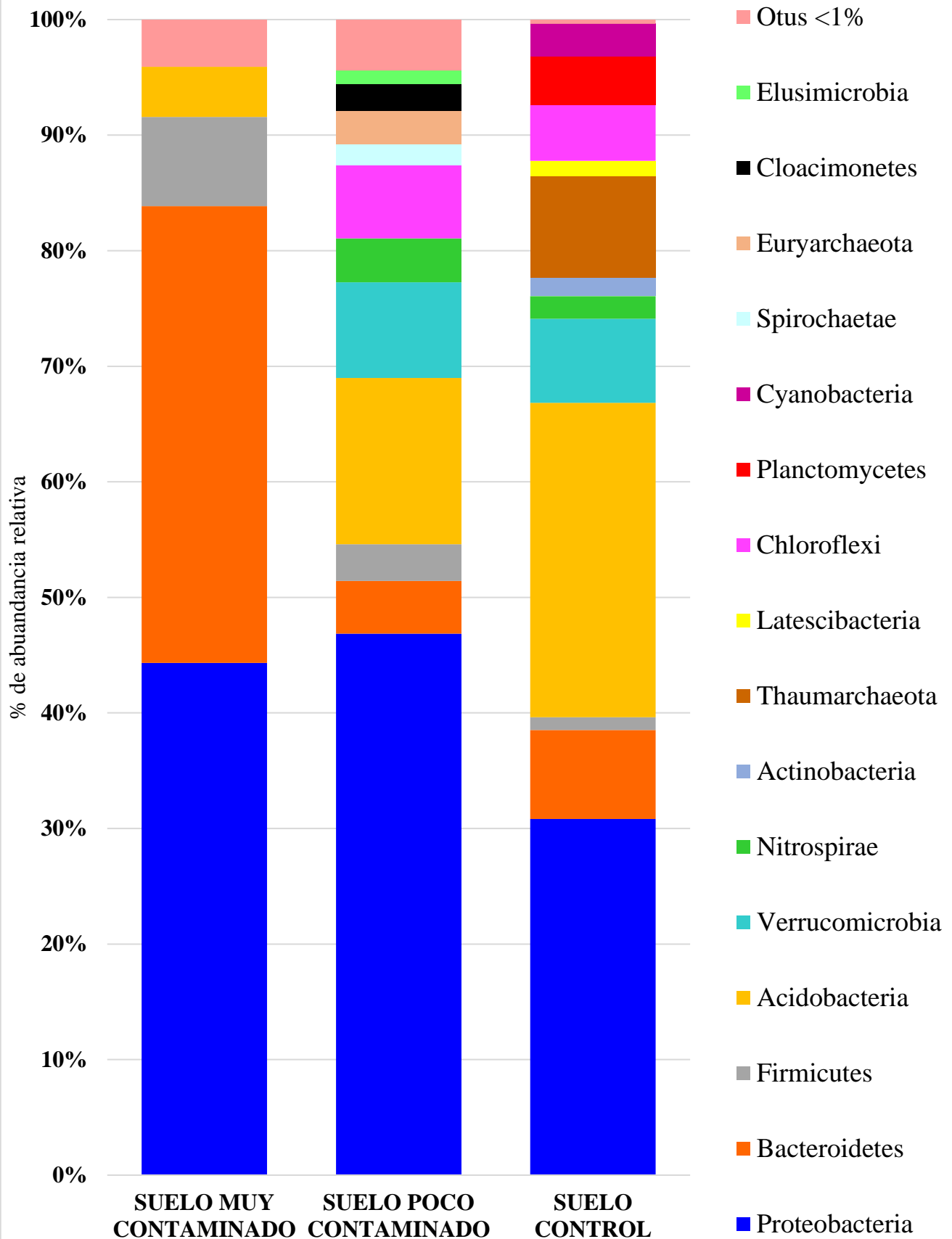
A) Comunidades bacterianas encontradas en muestras de Suelo:

La caracterización a nivel de filo mostró 16 comunidades bacterianas mayores al 1% de abundancia relativa en el metagenoma de las muestras de suelo, los filos más abundantes y representativos fueron *Proteobacteria* que presentó una abundancia mayor en suelo muy contaminado con un 44% de abundancia a diferencia del suelo control que le encontró en un 30%, *Bacteroidetes* se presentó también más abundante en suelo contaminado con un 39.5% marcando una diferencia significativa con el suelo control donde presentó un 7% de abundancia, *Acidobacteria* a diferencia de los anteriores presentó mayor abundancia en el suelo control con un 27% que en suelos contaminados (14% en poco contaminado y 4% suelo muy contaminado).

Los porcentajes de abundancia relativa de cada filo se detallan en el gráfico 3.1

- Las tablas complementarias con la información de los gráficos a partir de este punto se muestran en el capítulo de anexos.

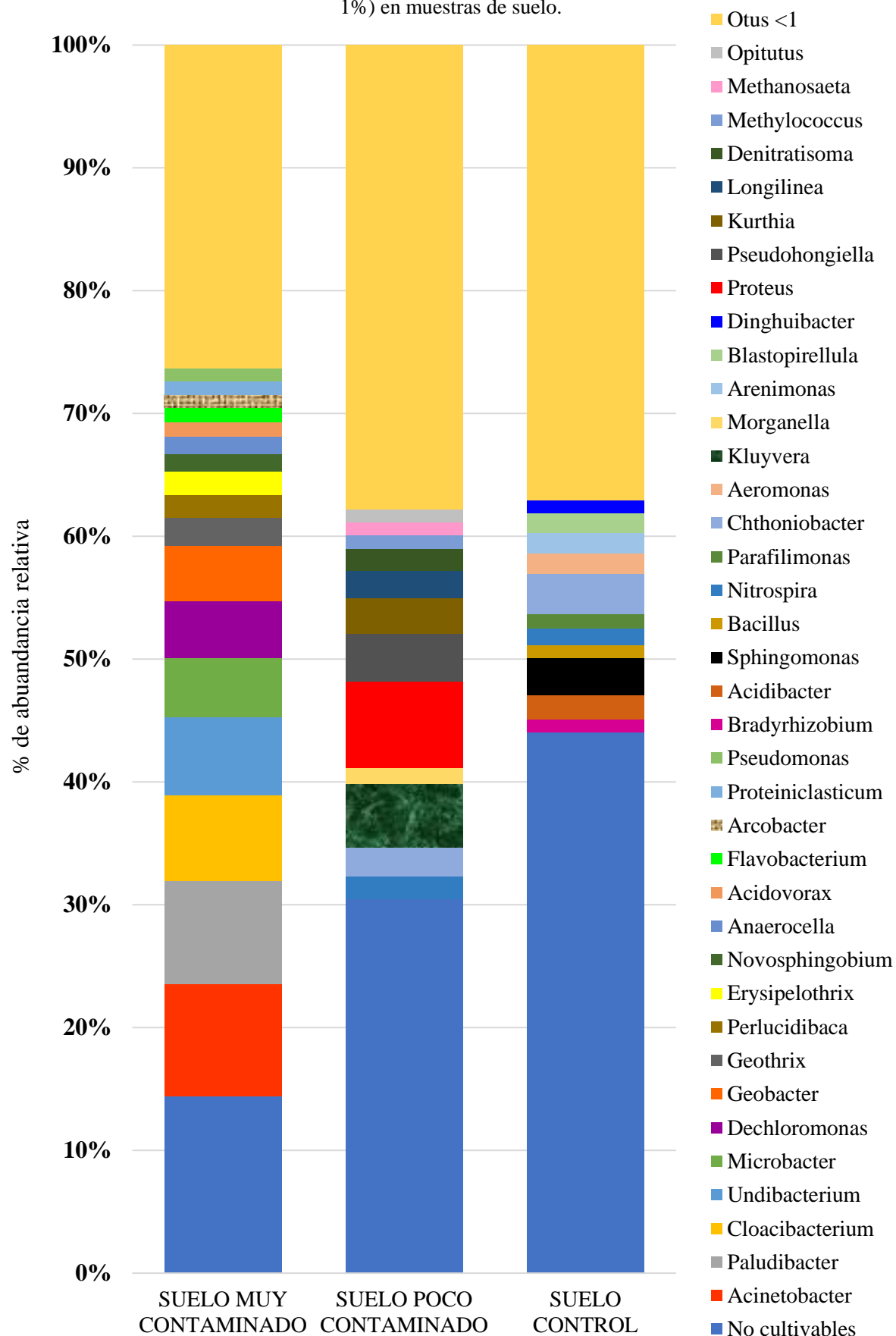
Gráfico 3.1. Abundancia relativa de las comunidades bacterianas a nivel de filo mayores al 1%.



El análisis a nivel de género con respecto a los cultivables hasta la actualidad arrojó como líder en abundancia en suelo muy contaminado a *Acinetobacter* con un 9% a diferencia del suelo poco y no contaminado en los que no fue detectado, y a *Paludibacter* que representó un 8% en suelo muy contaminado siendo detectado además en suelo poco contaminado con una abundancia relativa inferior al 1% pero no en suelo control; con respecto al suelo poco contaminado *Proteus* fue el género que representó mayor abundancia con un 7% seguido de *Pseudohongiella* con un 3% sin ser detectados en los suelos muy contaminado o suelo control; el género *Sphingomonas* en cambio, fue el más abundante en suelo control con un 3% siendo detectado en cifras inferiores al 1% en suelos contaminados, *Chthoniobacter* fue el segundo más abundante en suelo control con un 2% detectándose además en suelo muy contaminado pero por debajo del 1% de abundancia. Curiosamente *Pseudomonas* un género no sólo ampliamente reportado en zonas contaminadas con petróleo sino también en aplicación de biorremediación del mismo se detectó solo en 1% de abundancia en suelos muy contaminados y por debajo de ese porcentaje en suelo poco contaminado y control, parecido es el caso de *Bacillus* que se encontró por debajo del 1% en suelos contaminados y con un 1% de abundancia en el suelo control.

Los detalles se muestran en el gráfico 3.2 en el cual los géneros no cultivables hasta la fecha, se incluyeron en un solo ítem, encontrándose con una abundancia del 14% en suelo muy contaminado, 30% en poco contaminado y 44% en suelo contaminado, mostrando una disminución de este tipo de bacterias frente al contaminante.

Gráfico 3.2. Abundancia relativa de géneros bacterianos cultivables (mayores al 1%) en muestras de suelo.

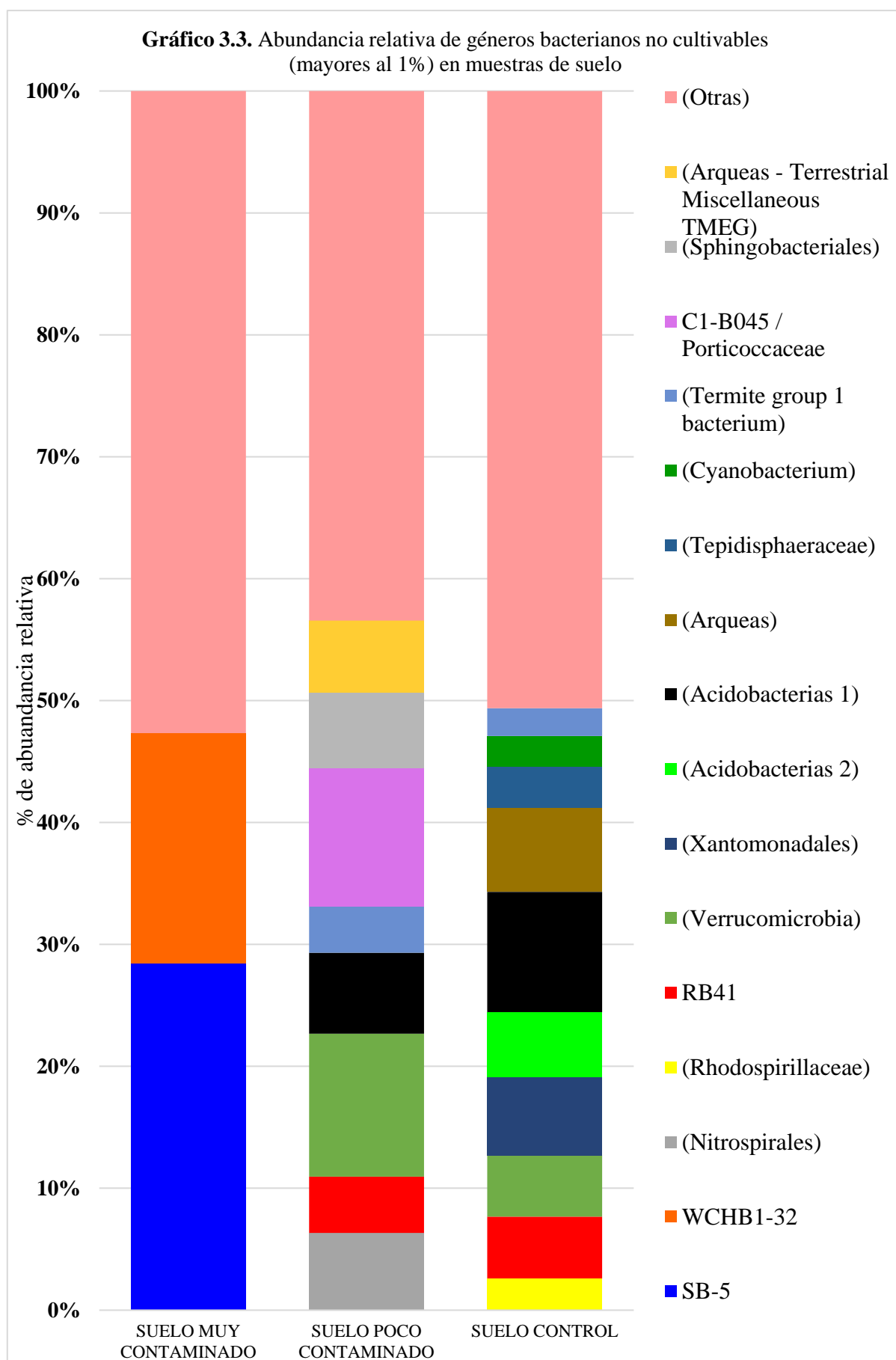


En cuanto a los no cultivables mayores al 1% se detectaron 16 géneros bacterianos, los cuales por su dificultad para lograr cultivarlos hasta la fecha aún no están bien definidos con un nombre específico a pesar de que se conoce parte de su secuencia de ADN, por lo cual la base de datos empleada en este trabajo (Silva) les da un código (género bacteriano), o en todo caso los relaciona con un orden, familia o género por la identidad compartida del fragmento de ADN 16S ARNr utilizado en su identificación que es el nivel organizacional hasta el que se logró determinar, ubicación geográfica, zona u organismo en el cual se les detectó por primera vez.

Así tenemos por ejemplo el género no cultivable nombrado como SB-5 que fue detectado sólo en suelo muy contaminado y fue el más abundante en esta muestra con un 4%, que tiene mucha similitud de secuencia con el filo *Bacteroidetes* lo cual nos lleva a indicar que pertenece a dicho filo bacteriano; para el caso de suelo poco contaminado el género más representativo fue C1-B045 con un 3% que se le relaciona con la familia *Alteromonadaceae* y que se detectó por primera vez en aguas profundas y sedimentos hidrotermales (Teske, 2002) pero no fueron detectados en suelo control o muy contaminado; finalmente en suelo control se detectaron más abundantes dos géneros no cultivables relacionados con el mismo género *Acidobacteria* pero lo suficientemente diferentes a la vez para distinguirlos en dos grupos, para el primero con un 4% siendo detectado también en suelo poco contaminado con un 2% y para el segundo se le encontró en un 2% en suelo control y en los suelos contaminados con una abundancia inferior al 1%.

Del porcentaje total de no cultivables: 14% en suelo muy contaminado, 31% en suelo poco contaminado y 44 % en suelo control se muestra la distribución de abundancias

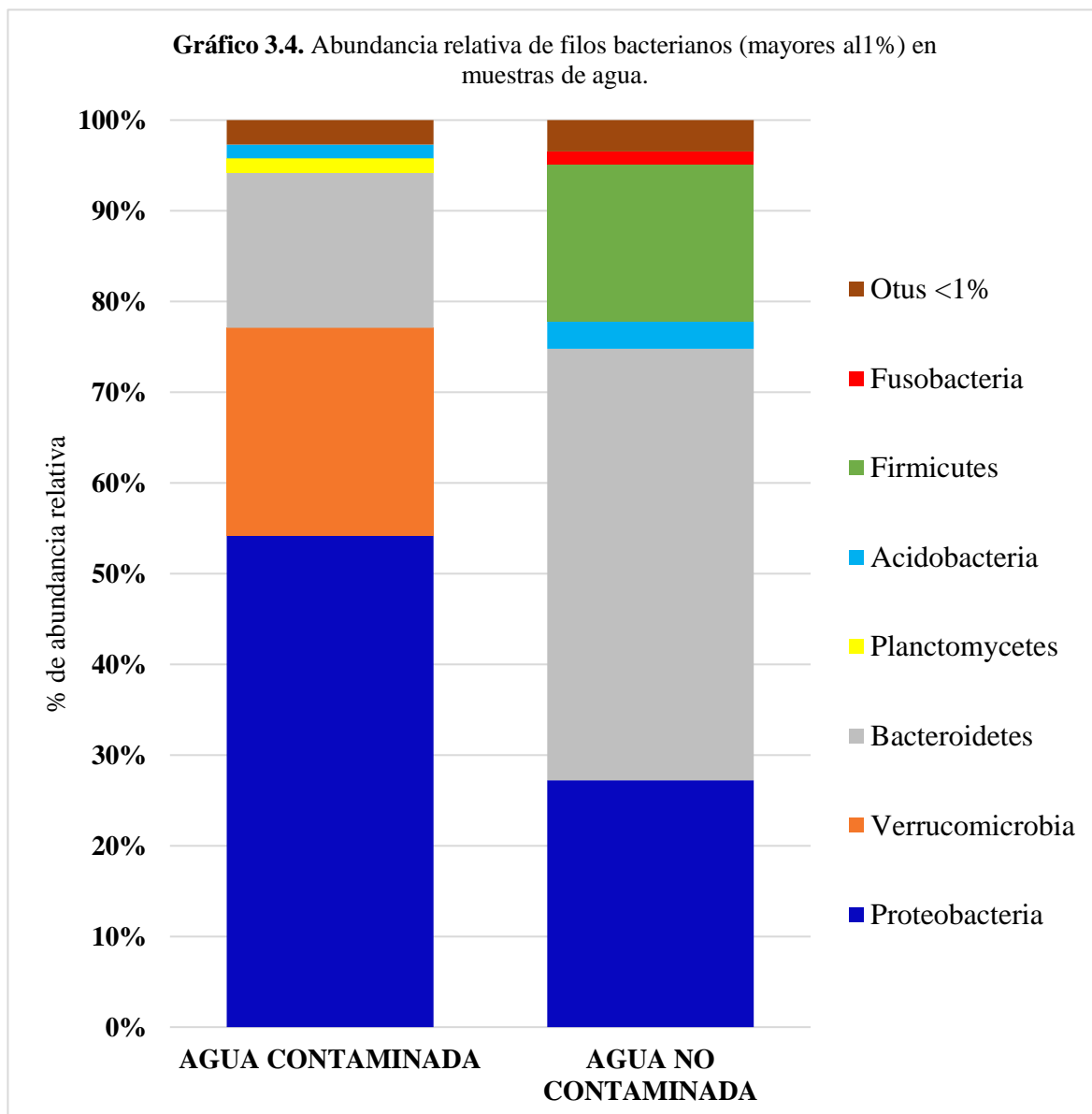
tomando esos datos como el 100% en el gráfico 3.3 que se muestra a continuación.



B) Comunidades bacterianas encontradas en muestras de agua:

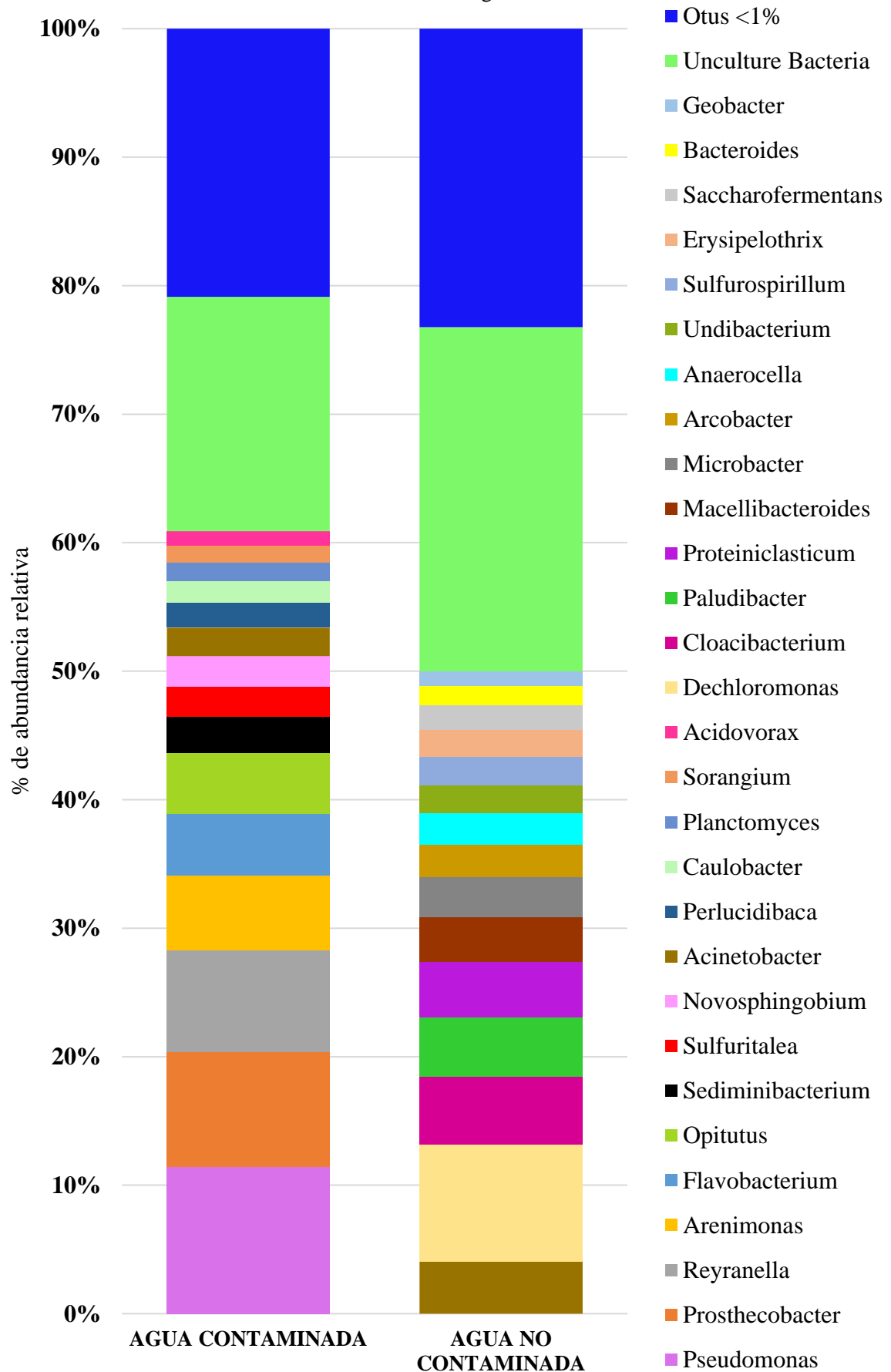
En las muestras de agua, se detectaron 7 filos bacterianos representativos (es decir mayores al 1% de abundancia) de los cuales *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Acidobacteria* fueron compartidos por ambas muestras (agua contaminada y agua no contaminada o control) siendo *Proteobacteria* el filo más abundante en agua contaminada con un 53% a diferencia del agua control en la que se detectó en un 27.1% y *Bacteroidetes* como más abundante el agua control con un 47.4% de abundancia relativa en contraste con el agua contaminada que se presentó en un 16.8%, ambos filos bacterianos se mostraron como más abundantes también en muestras de suelo poco contaminado y muy contaminado indicando su prevalencia en ambientes impactados por hidrocarburos de petróleo.

Por otro lado, los filos *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes* se detectaron únicamente en el agua contaminada y los filos bacterianos *Firmicutes* y *Fusobacteria* únicamente en el agua no contaminada (Ver gráfico 3.4).

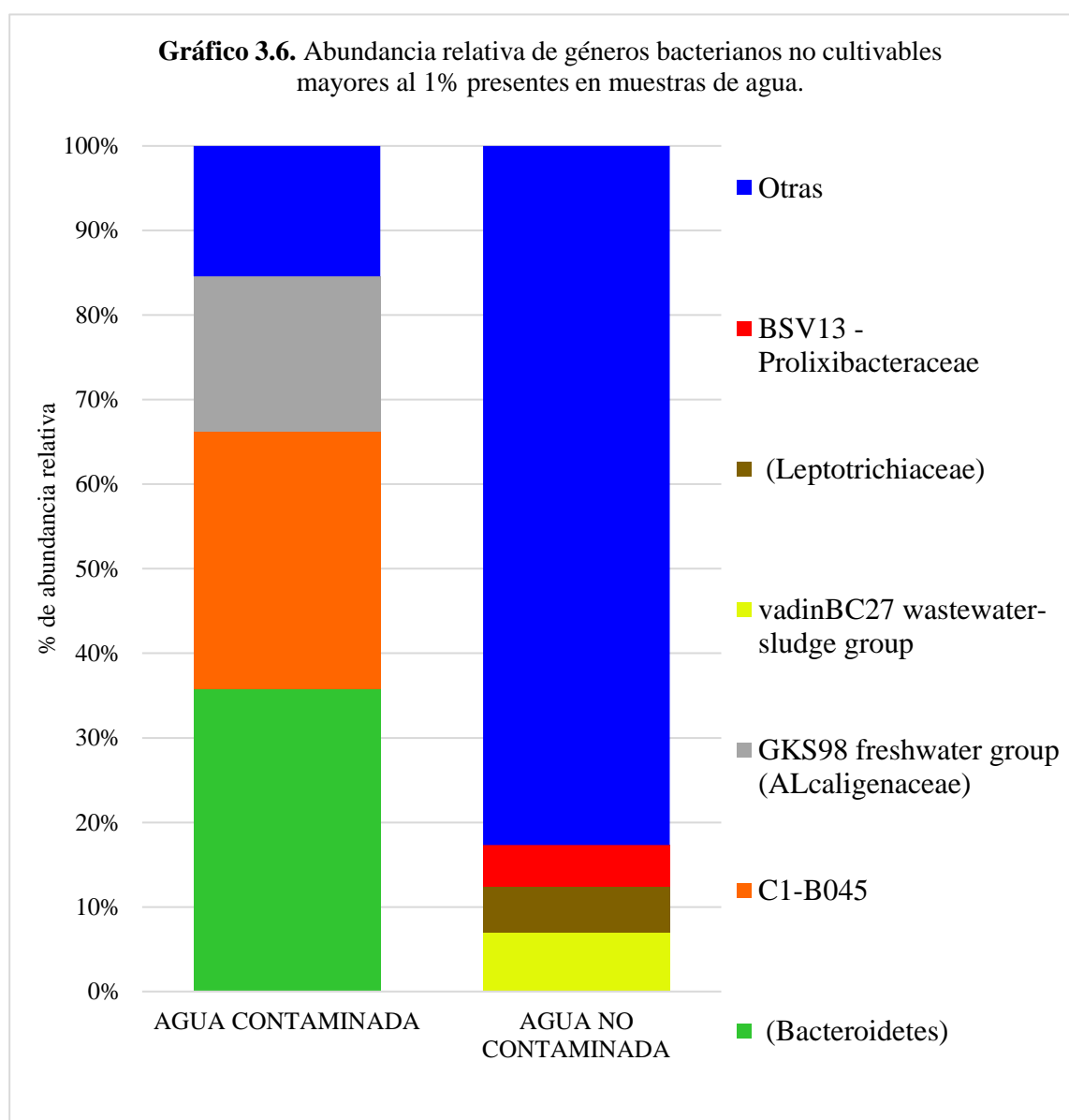


En el análisis de OTU´s a nivel de género se detectaron 40 géneros bacterianos presentes mayores al 1% de los cuales 24 son compartidos por ambos tipos de muestra, presentándose *Pseudomonas* un género bacteriano altamente referenciado por colonizar ambientes contaminados como más abundante en aguas contaminadas y *Dechloromonas*, un género perteneciente al filo de las proteobacterias en aguas no contaminadas. Los detalles se muestran en el gráfico 3.5.

Gráfico 3.5. Abundancia relativa de géneros (mayores al 1%) presentes en muestras de agua.



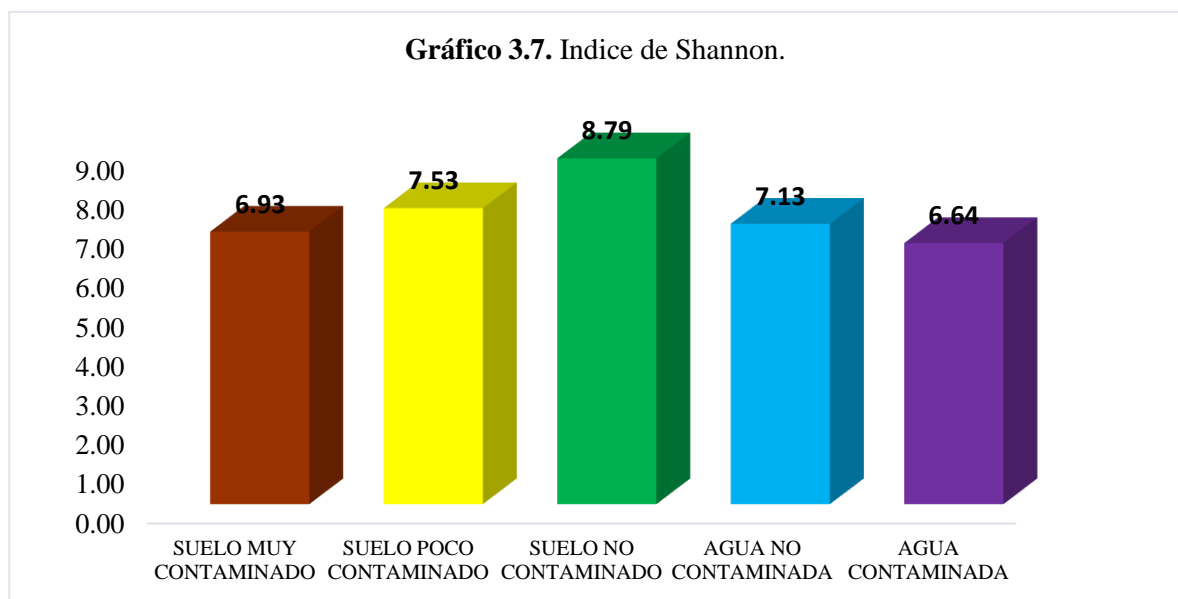
Con respecto a los no cultivables mayores al 1% de abundancia, se determinó el 17% para agua contaminada y 25 % para agua no contaminada por hidrocarburos de petróleo detectando 6 OTU's identificados con un código o relacionados con algunos OTU's ya conocidos (se muestran entre paréntesis), los datos se muestran en el gráfico 3.6 que detalla la abundancia de estos OTU's solo con respecto a no cultivables, es decir 17 y 25% pasan a ser el 100% en su respectiva muestra.



3.3. Análisis Comparativo de las comunidades bacterianas en las muestras:

A) Diversidad alfa:

Índice de Shannon: Se obtuvo un índice de Shannon mayor en las muestras de suelo y agua no contaminado, decreciendo conforme aumentó el nivel de contaminación. Los detalles se muestran en el gráfico 3.7.



B) Diversidad beta: Mediante el diagrama de Venn se analizaron los géneros compartidos y no compartidos en las muestras, independientemente de su abundancia relativa. Encontrando 58 géneros bacterianos compartidos por los tres tipos de suelo como *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas*, 35 compartidos entre aquellas contaminadas con petróleo, allí tenemos a *Morganella* que fue un género aislado y 10 entre suelo muy contaminado y no contaminado, los detalles se muestran en la figura 3.9, 3.10 y tabla 3.11.

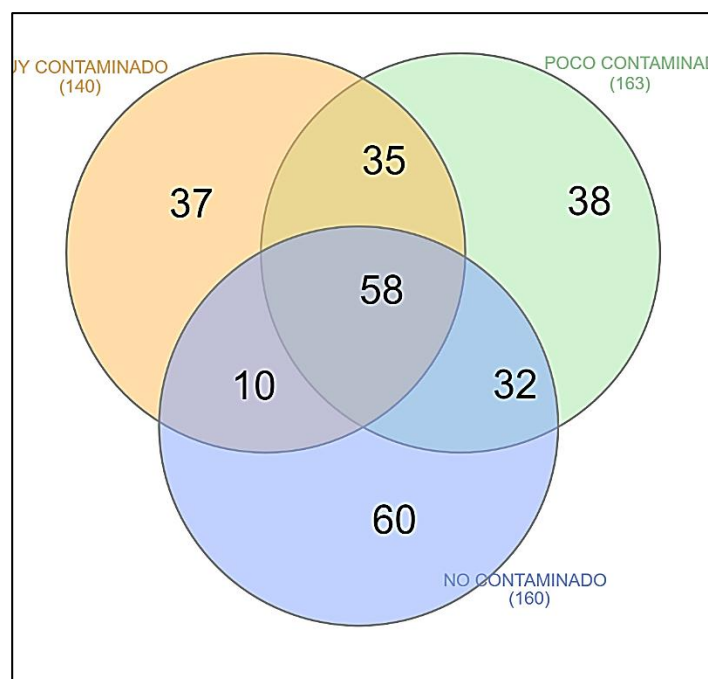


Figura 3.9. Diagrama de Venn de géneros bacterianos presentes en muestras de suelo.

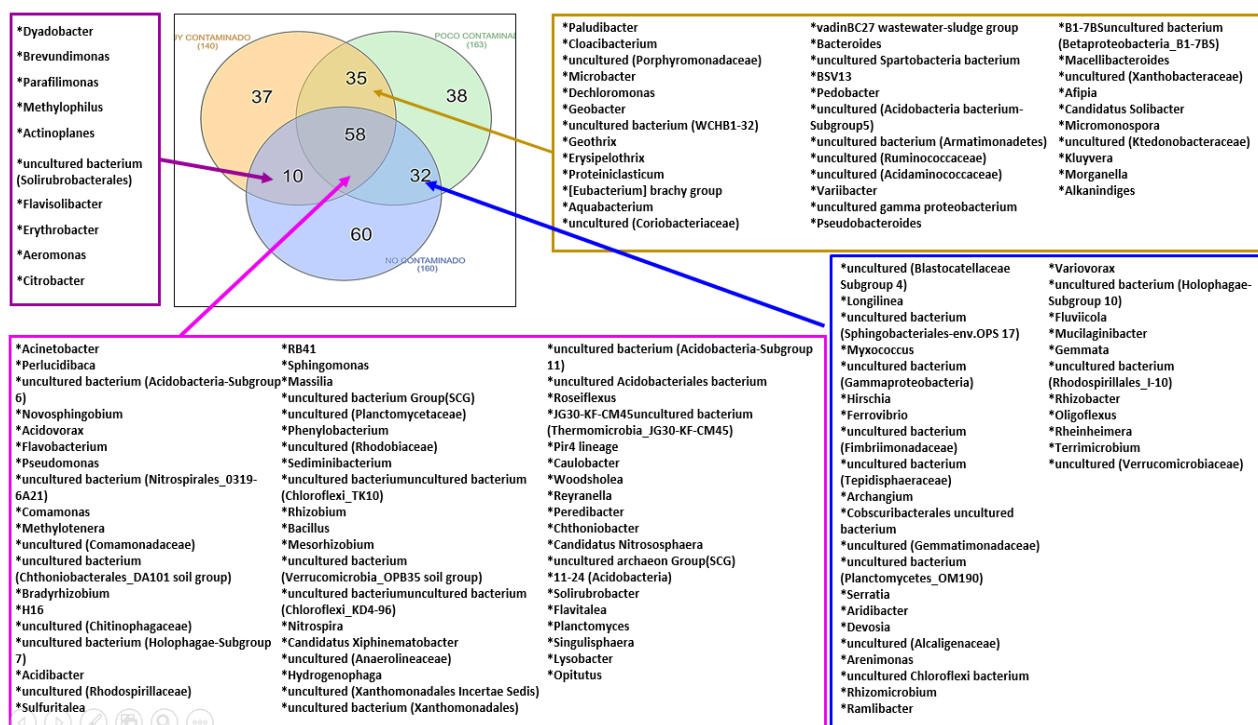


Figura 3.10. Diagrama de Venn detallado de géneros bacterianos presentes en muestras de suelo.

Tabla 3.11. Géneros bacterianos no comunes en las muestras de suelo

MUY CONTAMINADO	POCO CONTAMINADO	NO CONTAMINADO
Undibacterium	Proteus	Blastopirellula
uncultured bacterium (Bacteroidetes-SB-5)	uncultured bacterium (Gammaproteobacteria_PYR10d3)	uncultured cyanobacterium
Anaerocella	Pseudohongiella	Dinghuibacter
Arcobacter	C1-B045	Microvirga
uncultured (Rikenellaceae)	Kurthia	Herpetosiphon
Azovibrio	uncultured bacterium (Acidobacteria-Subgroup 22)	Chitinophaga
Fonticella	uncultured archaeon Gp(TMEG)	Cellvibrio
Mobilitalea	Denitratisoma	Simiduia
Microvirgula	uncultured bacterium (Acidithiobacillales)	Phormidium
Herbaspirillum	uncultured Termite group 1 bacterium	Limnobacter
Clostridium sensu stricto 12	Methylococcus	Terrimonas
Uliginosibacterium	uncultured (Spirochaetaceae)	Nocardioidea
uncultured (Leptotrichiaceae)	Methanoseta	Blastocatella
Giesbergeria	uncultured bacterium (Bacteroidetes vadinHA17)	Leptolyngbya
uncultured (Rhodocyclaceae)	Enterobacter	uncultured (Nitrosomonadaceae)
Chryseobacterium	Bryobacter	Arthronema
Ruminococcaceae NK4A214 group	Vibrio	Tabrizicola
uncultured (Peptococcaceae)	Treponema	uncultured bacterium (Tectomicrobia)
uncultured bacterium (Lentimicrobiaceae)	Dechlorobacter	Rubrobacter
Prevotellaceae UCG-001	uncultured soil bacterium (Gammaproteobacteria)	C0119uncultured bacterium (Ktedonobacteria)
uncultured bacterium (Bacteroidales RF16)	uncultured (Gallionellaceae)	uncultured (Cyanobacteria_SubsectionIII;FamilyI)
Sedimentibacter	uncultured bacteriumuncultured bacterium (Planctomycetes_BD7-11)	uncultured bacterium (Solirubrobacterales 288-2)
uncultured Prolixibacter sp.	Azoarcus	Microcoleus
Prevotella 7	uncultured (Moraxellaceae)	Rhodopirellula
Pseudarcicella	Prostheobacter	Bosea
Bdellovibrio	Dokdonella	Pseudoxanthomonas
Dysgonomonas	Methyloversatilis	Rhodoplanes
Saccharofermentans	uncultured bacterium (Rickettsiales_TK34)	uncultured bacterium (Rhodospirillales_DA111)
Sulfurospirillum	Rhodobacter	uncultured bacterium (Myxococcales_Biri41)
Prevotella 9	uncultured (Hydrogenophilaceae)	uncultured bacterium (Acidimicrobiales)
Fusibacter	uncultured bacterium (Acidobacteria-Subgroup 5)	Adhaeribacter
Anaerovorax	uncultured bacterium (Hydrogenedentes)	Aminobacter
Trichococcus	Asticcacaulis	Paracoccus
Ochrobactrum	uncultured (Hyphomonadaceae)	Fodinibacter
uncultured bacterium (PeM15-Actinobacteria)	Sorangium	uncultured bacterium (Kallotenuales)
Empedobacter	uncultured bacterium (Proteobacteria_SPOTSOC00m83)	Candidatus Alysiosphaera
Acidaminobacter	uncultured Verrucomicrobia bacterium Verrucomicrobia bacterium	Porphyrobacter
	Candidatus Methyloacidiphilum	Paucibacter
		Iamia
		uncultured bacterium (Gaiellales)
		Rhodocytophaga
		Cnuella
		uncultured bacterium (Sphingobacteriales-NS11-12)
		uncultured bacterium (Sphingobacteriales)
		uncultured bacterium (Chloroflexi_Gitt-GS-136)
		uncultured (Cyanobacteria_FamilyI)
		Oscillatoria
		Planktothrix
		Spirulina
		Lysinibacillus
		Sporosarcina
		Gemmatimonas
		Phyllobacterium
		uncultured (Acetobacteraceae)
		Azohydromonas
		Leptothrix
		Polaromonas
		Paucimonas
		G55
		uncultured bacterium (Oligoflexales_0319-6G20)

Por otro lado, con respecto a las muestras de agua compartieron 104 géneros bacterianos, como *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y la bacteria no cultivable RB1, además el agua contaminada presentó 38 géneros únicos de esa muestra y 61 únicos del agua no contaminada. Los detalles se muestran en las figuras 3.11 y 3.12.

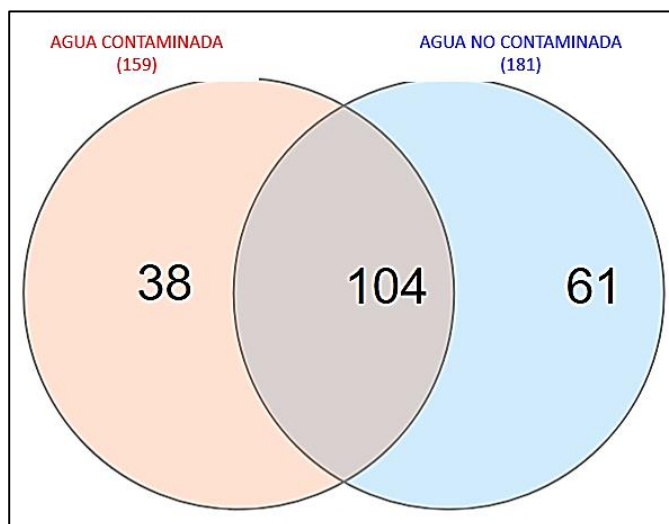


Figura 3.11. Diagrama de venn a nivel de género de muestras de agua contaminada y no contaminada.

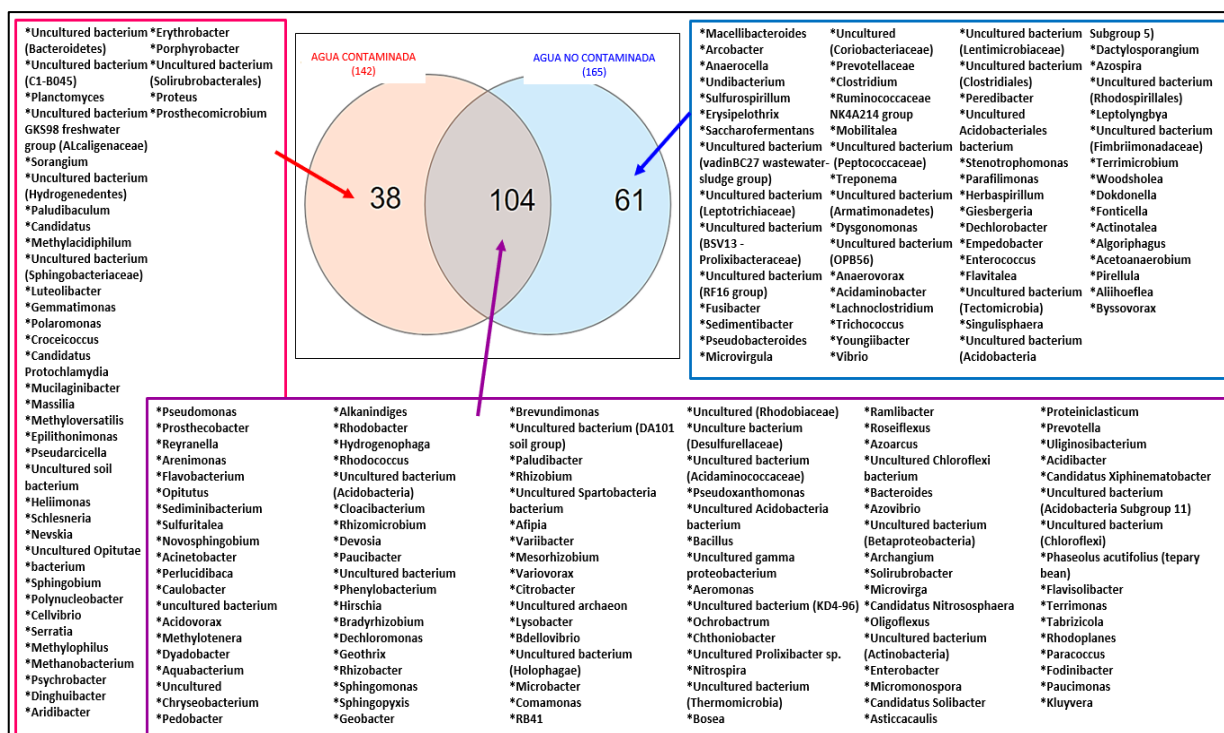


Figura 3.12. Diagrama de venn detallado a nivel de género de muestras de agua contaminada y no contaminada.

IV. DISCUSIÓN

Para el aislamiento de las bacterias cultivables se emplean medios de cultivo suplementados con petróleo de ésta manera se le dan al medio las condiciones de contaminación en las cuales crecen estas cepas bacterianas, como por ejemplo Pérez (2008) que utilizó petróleo de mesa de Puerto Escondido (80:20) aislando 9 cepas bacterianas del género *Pseudomonas*, Al-Dhabaan (2018) aisló *Pseudomonas* y *Bacillus* y Pacwa-Płociniczak (2016) que aisló *Rhodococcus*, *Serratia*, *Rhanella* y *Proteus*. En este estudio se empleó también petróleo, obtenido de la zona del derrame para aislar las cepas bacterianas presentes; que dicho sea de paso son ampliamente referenciadas como propias de estas zonas, así tenemos *Pseudomonas* (Pérez, 2008; Pacwa, 2016; Al-Dhabaan, 2018; Samanez, 2008; Poulomi, 2017); *Proteus* (Pacwa, 2016; Sunday, 2015; Iqbal, 2016); *Morganella* (Allamin, 2014; Subramanian, 2015; Nkanang, 2018); *Serratia* (Allamin, 2014; Subramanian, 2015; Pacwa-Płociniczak, 2016; Nalini, 2013); *Klebsiella* (Chao, 2010; Liu, 2014; Ghosh, 2017); *Enterobacter* (Nkanang, 2018; Samanez, 2008; Poulomi, 2017) y *Acinetobacter* (Samanez, 2008; Chao, 2010).

Para la caracterización de estas bacterias cultivables, una de las técnicas más usadas desde hace algunas décadas es la amplificación de los genes ribosomales que codifican para la subunidad 16S (ADNr 16S). Este marcador es una herramienta muy poderosa ampliamente usada en clasificaciones filogenéticas, debido a que su secuencia es altamente conservada (Hernandez, 2010). Se ha demostrado que la secuencia del 16S ARNr tiene un alto grado de resolución a un nivel taxonómico superior al de especie (Rosselló y Amann, 2001). En este estudio se aplicó esta técnica, la cual permitió identificar a nivel de especie cada una de las cepas aisladas; así mismo, el secuenciamiento de próxima generación por *Illumina* se realizó dirigido este mismo gen permitiéndonos encontrar no sólo géneros bacterianos, sino también sus abundancias relativas.

La metagenómica abrió nuevos caminos para la microbiología. Hoy es creciente el número de metodologías propuestas para estudios sobre los microorganismos (Larceda, 2013) mostrándose como una técnica complementaria a la microbiología tradicional. Stefani (2015) en su análisis dependiente e independiente cultivo encontró una gran diversidad bacteriana por técnicas independientes de cultivo en comparación con las dependientes de cultivo sugiriendo que los microbios que se seleccionan por cultivo no son ni siquiera representativos de aquellos que son altamente competitivos en el medio ambiente. En concordancia a lo citado, el presente trabajo ha obtenido resultados alentadores para este campo de investigación, mostrando una amplia diversidad de géneros bacterianos siendo los más abundantes no necesariamente los aislados. Esto significa que ambos métodos son complementarios (Franck et al., 2015).

Ruiz, (2014) realizó el análisis metagenómico de zonas contaminadas y no contaminadas con hidrocarburos de petróleo en la Amazonía de Brasil, en la provincia de Urucu, encontrando al filo *Proteobacteria* como el más abundante; así también lo determinó Larceda (2013) en zonas contaminadas y no contaminadas con diesel, un derivado del petróleo. De manera similar sucedió con los resultados este trabajo, en los que *Proteobacteria* fue el filo más abundante y presente tanto en muestras de agua como de suelo contaminados y no contaminados, presentándose en mayor abundancia en las muestras contaminadas con petróleo.

Larceda (2013), también encontró en petróleo como filos más representativos, después de *Proteobacteria*, a *Bacteroidetes* y *Acidobacteria*. La ubicuidad y la abundancia de las Acidobacterias en los suelos y su capacidad de resistencia a la contaminación y a ambientes extremos, sugieren que éstas presentan funciones potencialmente importantes en el medio ambiente (Ward, 2009). De la misma forma este estudio determinó a *Bacteroidetes* y

Acidobacteria como representativos por su abundancia relativa, encontrándose en mayor proporción para el caso de suelos en suelo muy contaminado y poco contaminado y para el caso de agua en el agua no contaminada.

El índice de Shannon es un índice de diversidad general que es sensible tanto a la riqueza de especies como a la abundancia de especies relativas (Atlas y Bartha, 1998); Borowik (2017) sugiere que la contaminación de suelo por aceites derivados de petróleo como el diesel tienen un efecto adverso sobre las poblaciones de hongos, probado por su índice de Shannon más bajo a partir de muestras contaminadas, de manera similar a lo encontrado en este trabajo, aunque para el caso de bacterias el índice de Shannon se muestra más bajo en las muestras de suelo y agua contaminadas.

La perspectiva sobre la diversidad microbiana ha mejorado enormemente en las últimas décadas. En gran parte, esto se debió a estudios filogenéticos moleculares que relacionan organismos objetivamente. Se estima que más del 99% de los microorganismos observables en la naturaleza normalmente no se cultivan mediante el uso de técnicas estándar (Amann, 1995). Es por ello que en este trabajo se han utilizado también técnicas independientes de cultivo para tener una visión más real de todas las comunidades bacterianas que están presentes en las muestras de agua, llegando incluso a detectar bacterias no cultivables.

Las bacterias pueden ser sensibles a los pequeños cambios en las condiciones del medio ambiente. Como resultado, ciertos microambientes del suelo que son relevantes para la distribución bacteriana afectan las comunidades (Franck et al., 2015). Esto explica cómo es que los géneros bacterianos predominantes en las muestras analizadas independientemente de cultivo no lograron ser aisladas, puesto que un medio de cultivo “trata” de brindar las

condiciones adecuadas para el crecimiento de las bacterias, pero se debe tomar en cuenta que el ambiente en el cual se han desarrollado naturalmente no solo intervienen los nutrientes y el contaminante; sino también las condiciones ambientales, las cuales no pueden imitarse al 100% en un aislamiento microbiológico.

Samanez (2008) aisló cepas bacterianas correspondientes a los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* a partir de muestras contaminadas con petróleo; así mismo, en este trabajo el género *Pseudomonas* fue encontrado por técnicas dependientes e independientes de cultivo en muestras de agua y suelo con o sin contaminación por petróleo pero con mayor abundancia en muestras contaminadas; por ello, es empleado en biorremediación como por ejemplo por Wu (2017) y Ramadass (2018). *Acinetobacter* fue detectado por técnicas independientes de cultivo en todas las muestras, pero solo se logró aislar a partir de muestras de agua contaminada a pesar que representó abundancias superiores al 1% en el suelo contaminado; este género también es utilizado en bioorremediación, por ejemplo, por Brzeszcz (2016) y estudiado (capacidades para la biorremediación) por Chao (2010).

Proteus es un género bacteriano altamente reportado en zonas contaminadas con hidrocarburos, al igual que en los consorcios microbianos biorremediadores de este contaminante (Pacwa, 2016; Sunday, 2015; Iqbal, 2016). En la presente investigación, *Proteus* fue uno de los géneros que se aislaron y detectaron por metagenómica pero solo en muestras contaminadas con petróleo, tanto de suelo como de agua lo cual lo define como un bioindicador de contaminación al igual que los dos géneros anteriores y con características ideales para su uso potencial en biorremediación.

Serratia es un género bacteriano productor de biosurfactantes para la biodegradación de

hidrocarburos de petróleo basados en sus requisitos nutricionales y fisiológicos; es nativa de zonas contaminadas con petróleo (Almansoori, 2017) y fue uno de los géneros bacterianos que se logró aislar a partir de muestras de agua y suelo contaminados con petróleo pero también del petróleo colectado del suelo, a pesar de que esta bacteria no pudo ser detectada por metagenómica en muestras de suelo, solo en agua contaminada y con una abundancia no representativa. Otro de los géneros productores de biosurfactantes fue *Bacillus* (Sharma, 2018), uno de los géneros que no se logró aislar en esta investigación, pero que si se detectó en muestras de suelo muy contaminado y poco contaminado por análisis metagenómico.

Por análisis metagenómico de un ensayo de biodegradación de hidrocarburos en campo y a gran escala, Poi (2018) determinó a *Flavobacterium* como un género dominante de la población bacteriana durante el proceso; en el presente estudio ese mismo género fue detectado por metagenómica en todas las muestras, pero mucho más abundantes en las muestras contaminadas; sin embargo, no se logró aislar demostrándose que los cultivos no siempre muestran toda la comunidad bacteriana presente.

V. CONCLUSIONES

- Las técnicas dependientes de cultivo permitieron aislar y caracterizar por secuenciamiento del gen 16S ARNr 6 y 7 cepas de suelos aguas contaminadas respectivamente.
- Los géneros *Pseudomonas*, *Proteus* y *Serratia* comunes para ambos tipos de muestra y *Morganella* único para suelo; así como, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Acinetobacter* únicos para muestras de agua fueron caracterizados a partir de técnicas dependientes de cultivo.
- Mediante técnicas independientes de cultivo (metagenómica dirigida al gen 16S ARNr) se lograron determinar géneros bacterianos cultivables y no cultivables.
- El género más representativo por metagenómica de suelos contaminados fue *Acinetobacter* (muy contaminado) y *Proteus* (poco contaminado) y *Chthoniobacter* en muestras de suelo no contaminado.
- El género más representativo de agua contaminada fue *Pseudomonas* y *Dechloromonas* en muestras de agua no contaminada.
- Las muestras de suelo contaminado y no contaminado compartieron 56 géneros bacterianos en común; así mismo las muestras de agua contaminadas y no contaminadas compartieron 104.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el análisis de expresión de genes degradadores de hidrocarburos, así como ensayos de degradación *in vitro* e *in situ* con las cepas obtenidas para una validación de su uso en biorremediación.

- Promover el uso de técnicas de caracterización independientes de cultivo (NGS) para el monitoreo de tecnologías de biorremediación aplicadas en zonas contaminadas con hidrocarburos de petróleo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Dhabaan, F. (2018). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Allamin, A. I. (2014). Occurrence of hydrocarbon degrading bacteria in soil in kukawa, borno state. *International journal of environment*, 36-47.
- Almansoor, A. A. (marzo de 2017). Producción de biosurfactantes por parte de las bacterias que degradan los hidrocarburos (HDB) *Serratia marcescens* : Optimización utilizando un diseño central compuesto (CCD). *Revista de Química Industrial e Ingeniería*, 47, 271-280.
- Amann, R. L. (1995). Identificación filogenética y detección in situ de células microbianas individuales sin cultivo. *Microbiología*, 143-169.
- Aspetegui, A., & Bratovich, C. (1999). *bacterias degradadoras de petróleo y derivados*. Argentina.
- Atlas, R. &. (2002). *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental* (Cuarta Edición ed.). Madrid: Editorial Pearson Educación, SA.
- Atlas, R., & Bartha, R. (1998). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Benjamin/Cummings Publishing Co, 593p.
- Baheri, H. (2001). Meysami, Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil. *J. Hazard. Mater*, 279-286.

- Barreto, M. H. (2012). Unveiling the fungal gal mycobiota present throughout the cork stopper manufacturing process. *FEMS Microbiol Ecol*, 82, 202–214.
- Benavides, L., Quintero, G., Guevara, V., & Jaimes, D. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 1-116.
- Ben-Dov, E., Kramarsky, E., & Kushmaro, A. (2009). An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS Microbiology Ecology*, 68, 363-371.
- Bento, F. O. (Agosto de 2005). Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research* (160), 249-255. doi:10.1016/j.micres.2004.08.005
- Borowik, A. W. (2017). Functional Diversity of Fungal Communities in Soil Contaminated whit Diesel Oil. *Frontiers Microbiology*, 8(1862).
- Bossert, I. B. (1984). ATLAS R.M. (Ed.), Petroleum Microbiology. En *The fate of petroleum in soil ecosystems* (pág. 473). New York: Macmillan Publishing Co.
- Brzeszcz, J. S. (2016). r-strategist versus K-strategist for the application in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 106, 41-52.
- Chaerun, S., Tazaki, K., Asada, R., & Kogure, K. (Septiembre de 2004). Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *ELSEVIER*, 911-922.

- Chao, Y. L. (2010). Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. *Fuel*, 3358–3364.
- Cisnero, E. (s.f.). Manual de Química Ambiental. *Programa de Educación Ambiental*, 1996. Lima, Perú: UNALM.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol. Res*, 1-13.
- Derrosi, D. A. (2014). *Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil*. International Biodeterioration & Biodegradation.
- Eckle, P., Burgherr, P., & Michaux, E. (2012). Risk of large oil spills: a statistical analysis in the aftermath of deepwater horizon. *Environ Sci Technol*, 46, 13002-13008. doi:10.1021/es3029523
- Escalante, R. (2002). *Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios*. Lima: Universidad Mayor de San Marcos.
- Franck, S., Bell, T., Marchand, C., De la Providencia, I., Yassimi, A., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (Junio de 2015). Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0128272
- Ghosh, S. S. (2017). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from chloroform extract of Carica papaya seed and its in vivo antibacterial potentiality in Channa punctatus against Klebsiella PKBSG14. *Microbial Pathogenesis*. doi:10.1016/j.micpath.2017.08.033

- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to. *Microbiology and Molecular Biology*, 68, 669-685.
- Haritash, A., & Kaushik, C. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Haz. Mat*, 1-15.
- Hernandez, R., Velázquez, I., Orozco, M., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Revista Internacional De Botánica Experimental*, 133-139.
- Hugenholtz, P. G. (1998). Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology*, 4765-4774.
- Hugenholtz, P., Hooper, S., & Kyrpides, N. (2009). Focus: Synergistetes. *Environ Microbiol*, 11, 1327-1329.
- INSSBT. (s.f.). *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo*. Recuperado el 05 de marzo de 2018, de <http://www.insht.es/portal/site/Insht/menuitem.1f1a3bc79ab34c578c2e8884060961ca/?vgnextoid=23c1c015b0842310VgnVCM1000008130110aRCRD&vgnnextchannel=9f164a7f8a651110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD>
- Iqbal, E. L. (2016). Isolation and characterization of Aristolactam alkaloids from the stem bark of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) and their Biological activities. *Journal of King Saud University - Science*.
- Kanally, R., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol*, 2059-2067.

- Kumar, A., Vijayakumar, L., Gajendra, J., Magesh, P., & Kirubakaran, D. (2014). Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresource Technology*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.008>
- Lagier, J. A. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect* , 1185–1193.
- Larceda, M. (2013). *Análise metagenômica da comunidade bacteriana em solos antropizados*. Recuperado el julio de 2018, de D Space - UFGD - Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales: <https://dspace.ufgd.edu.br/jspui/handle/123456789/525>
- Liu, W. H. (2014). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of petroleum-contaminated saline-alkali soil. *Chemosphere*, 303-308.
- Ministerio del Ambiente. (2013). Guia para el muestreo de suelos. *Estándares de calidad ambiental para suelos*. Perú: Vice Ministerio de Gestión Ambiental .
- Nalini, S. P. (2013). Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresource Technology*, 619-622.
- Nkanang, J. A. (2018). Hydrocarbonoclastic potentials of Enterobacteriaceae isolated from the crude oil polluted Iko river estuary and freshwater ecosystem of the Niger Delta Region of Nigeria. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 38-46.
- Ñustez, D. (2012). *Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes*

en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. Universidad tecnologica de pereira. Pereira: facultad de ciencias ambientales.

Pace, N. (1997). Una vista molecular de la diversidad microbiana y la biosfera. *Science* 276, 734-740.

Pacwa, M. P. (2016). Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *Journal of Environmental Management*.

Pacwa-Płociniczak, M. P.-S. (2016). Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits . *Journal of environmental management*, 175-184.

Perez, R. C. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *CENIC. Ciencias Biológicas*, 44-51.

Pérez, R. C. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *CENIC. Ciencias Biológicas*, 44-51.

Poi, G. S.-M. (2018). Large scale treatment of total petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater using bioaugmentation. *Journal of Environmental Management*, 214, 157-163.

Poulomi, S. A. (2017). Enrichment and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Petroleum Refinery Waste as Potent Bioaugmentation Agent for In Situ

Bioremediation . *Bioresource Technology*.

Ramadass, K. M. (2018). Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Science of The Total Environment*, 968-974.

Rittmann, B. (2001). *Biotecnología del medio ambiente, Principios y Aplicaciones*. España: McGraw-Hill.

Rodriguez, R. (01 de julio de 2018). *Teoría de conjuntos, Diagramas de Euler-Venn. Silogística formal*. Obtenido de probayest.wikispaces.com: https://probayest.wikispaces.com/file/view/rrr_conjuntos.pdf

Rosselló, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 39-67.

Ruiz, M. (2014). Ruiz, M. M. (2014). Análise da biodiversidade microbiana em ambiente aquático com despejo contínuo de efluentes de hidrocarbonetos. Universidade Federal do Amazonas - SISTEBIB. Obtenido de <http://200.129.163.131:8080/handle/tede/4304>

Samanez, E. (2008). Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. (F. d. Post-grado., Ed.) Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Sarubbi, A. (2000). *Aspectos importantes en biorremediación*. (Argentina, Editor) Recuperado el 09 de febrero de 2018, de AIDIS: <http://www.aidisar.org.ar>

Saul, D. A. (Junio de 2005). Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of

- soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(1), 141-155.
- Sharma, R. S. (2018). Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 132-139.
- Stams, A., De Bok, F., Plugge, C., Van, M., Dolfig, J., & Schraa, G. (2006). Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environmental Microbiology*, 8, 371-382.
- Stefani, F. B.-A. (2015). Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLOS One*, 10.
- Strong, W. (2008). Ecological Indicators. *ELSEVIER*, 703-713.
- Subramanian, A. M. (2015). Novel Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) degraders from oil contaminated soil samples. *International Journal of Advanced Research*, 999-1006.
- Sunday, A. O. (2015). Isolation and characterization of bacterial strains with pyrene metabolic functions from cow dung and *Terminalia catappa* phylloplane. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1878-8181.
- Teske, A. H. (Abril de 2002). Diversidad microbiana de sedimentos hidrotermales en la cuenca de Guaymas: evidencia de comunidades metanotróficas anaerobias. *Environmental Microbiology*, 68(4), 1994-2007.
- Tuo, B. Y. (2012). Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of *Bacillus* sp. isolated from petroleum-contaminated soil.

Bioresource Technology, 107, 55-60.

Van Hammet, J. S. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 503-549.

Vartoukian, S., Palmer, R., & Wade, W. (Agosto de 2010). Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 309, 1-7. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x.

Vaz-Moreira, I. E. (2011). Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100, 245–257.

Volke, T. V. (2002). Tecnologías de Remediación para Suelos contaminados. Méico D.F: Instituto Nacional de Ecología. Ine-Semarnat.

Ward, N. C. (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lefestyle of these microorganism in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 2046-2056.

Wu, M. Y. (2017). Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. *Environmental Pollution*, 657-664.

VIII. ANEXOS

8.1. Tablas complementarias de los resultados:

- Los datos que aparecen en rojo (para esta y el resto de tablas de abundancia) son aquellos inferiores al 1%, y no son mostrados en los gráficos, pero sí en las tablas para evidenciar que fueron detectados también en las otras muestras, aunque en cantidades inferiores a las tomadas como representativas (mayores a 1%).

Tabla 8.1.1. Abundancia relativa de filos bacterianos (mayores al 1%) en muestras de suelo.			
OTU's	SUELO MUY CONTAMINADO	SUELO POCO CONTAMINADO	SUELO CONTROL
<i>Proteobacteria</i>	0.4431	0.4651	0.3079
<i>Bacteroidetes</i>	0.3950	0.0454	0.0770
<i>Firmicutes</i>	0.0770	0.0314	0.0110
<i>Acidobacteria</i>	0.0434	0.1429	0.2718
<i>Verrucomicrobia</i>	0.0098	0.0822	0.0727
<i>Nitrospirae</i>	0.0077	0.0377	0.0195
<i>Actinobacteria</i>	0.0066	0.0097	0.0156
<i>Thaumarchaeota</i>	0.0046	-	0.0883
<i>Latescibacteria</i>	0.0020	0.0056	0.0131
<i>Chloroflexi</i>	0.0013	0.0629	0.0483
<i>Planctomycetes</i>	0.0010	0.0080	0.0418
<i>Cyanobacteria</i>	0.0006	0.0009	0.0283
<i>Spirochaetae</i>	-	0.0180	-
<i>Euryarchaeota</i>	-	0.0286	-
<i>Cloacimonetes</i>	-	0.0231	-
<i>Elusimicrobia</i>	-	0.0116	-
Otus <1%	0.0409	0.0437	0.0037

Tabla 8.1.2. Abundancia relativa de géneros bacterianos (mayores al 1%) en muestras de suelo.			
OTU's	SUELO MUY CONTAMINADO	SUELO POCO CONTAMINADO	SUELO CONTROL
No cultivables	0.1439	0.3044	0.4403
<i>Acinetobacter</i>	0.0916	0.0069	0.0067
<i>Paludibacter</i>	0.0839	0.0001	-
<i>Cloacibacterium</i>	0.0700	0.0038	-
<i>Undibacterium</i>	0.0635	-	-
<i>Microbacter</i>	0.0479	0.0009	-
<i>Dechloromonas</i>	0.0467	0.0001	-
<i>Geobacter</i>	0.0449	0.0050	-
<i>Geothrix</i>	0.0226	0.0040	-
<i>Perlucidibaca</i>	0.0189	0.0064	0.0002
<i>Erysipelothrix</i>	0.0187	0.0002	-
<i>Novosphingobium</i>	0.0148	0.0035	0.0005
<i>Anaerocella</i>	0.0137	-	-
<i>Acidovorax</i>	0.0120	0.0004	0.0005
<i>Flavobacterium</i>	0.0116	0.0007	0.0062
<i>Arcobacter</i>	0.0109	-	-
<i>Proteiniclasticum</i>	0.0107	0.0002	-
<i>Pseudomonas</i>	0.0102	0.0008	0.0097
<i>Bradyrhizobium</i>	0.0029	0.0046	0.0106
<i>Acidibacter</i>	0.0014	0.0022	0.0200
<i>Sphingomonas</i>	0.0010	0.0025	0.0301
<i>Bacillus</i>	0.0005	0.0001	0.0106
<i>Nitrospira</i>	0.0003	0.0185	0.0136
<i>Parafilimonas</i>	0.0002	-	0.0113
<i>Chthoniobacter</i>	0.0001	0.0238	0.0327
<i>Aeromonas</i>	0.0001	-	0.0170
<i>Kluyvera</i>	0.0001	0.0515	-
<i>Morganella</i>	0.0001	0.0129	-
<i>Arenimonas</i>	-	0.0004	0.0170
<i>Blastopirellula</i>	-	-	0.0156
<i>Dinghuibacter</i>	-	-	0.0106
<i>Proteus</i>	-	0.0710	-
<i>Pseudohongiella</i>	-	0.0387	-
<i>Kurthia</i>	-	0.0288	-
<i>Longilinea</i>	-	0.0224	0.0002
<i>Denitratisoma</i>	-	0.018	-
<i>Methylococcus</i>	-	0.0111	-
<i>Methanosaeta</i>	-	0.0106	-
<i>Opitutus</i>	-	0.0101	-
Otus <1	0.26358	0.37838	0.37064

Tabla 8.1.3. Abundancia relativa de géneros no cultivable (mayores al 1%) en muestras de suelo.

Géneros no cultivables:	SUELO MUY CONTAMINADO	SUELO POCO CONTAMINADO	SUELO CONTROL
<i>SB-5</i>	0.041	-	-
<i>WCHB1-32</i>	0.0271	0.0013	-
<i>(Nitrospirales)</i>	0.0075	0.0193	0.006
<i>(Rhodospirillaceae)</i>	0.0012	0.0033	0.0115
<i>RB41</i>	0.001	0.014	0.0223
<i>(Verrucomicrobia)</i>	0.0003	0.0357	0.0221
<i>(Xantomonadales)</i>	0.0002	0.0009	0.0285
<i>(Acidobacterias 2)</i>	0.0001	0.0008	0.0232
<i>(Acidobacterias 1)</i>	-	0.0202	0.0435
<i>(Arqueas)</i>	-	-	0.0304
<i>(Tepidisphaeraceae)</i>	-	0.0013	0.0149
<i>(Cyanobacterium)</i>	-	-	0.011
<i>(Termite group 1 bacterium)</i>	-	0.0116	0.01
<i>C1-B045</i>	-	0.0345	-
<i>(Sphingobacteriales)</i>	-	0.0188	0.0055
<i>(Arqueas - Terrestrial Miscellaneous TMEG)</i>	-	0.018	-
<i>(Otras)</i>	0.0758	0.1322	0.2229

Tabla 8.1.4. Abundancia relativa de géneros (mayores al 1%) presentes en muestras de agua.

OTUs	AGUA COTAMINADA	AGUA NO CONTAMINADA
<i>Pseudomonas</i>	0.10581	0.00504
<i>Prostheobacter</i>	0.08275	0.00002
<i>Reyranella</i>	0.07287	0.00008
<i>Arenimonas</i>	0.05454	0.00008
<i>Flavobacterium</i>	0.04438	0.00774
<i>Opitutus</i>	0.04353	0.00010
<i>Sediminibacterium</i>	0.02650	0.00008
<i>Sulfuritalea</i>	0.02179	0.00045
<i>Novosphingobium</i>	0.02166	0.00399
<i>Acinetobacter</i>	0.02039	0.03812
<i>Perlucidibaca</i>	0.01841	0.00150
<i>Caulobacter</i>	0.01517	0.00012
<i>Planctomyces</i>	0.01326	-
<i>Sorangium</i>	0.01256	-
<i>Acidovorax</i>	0.01014	-
<i>Dechloromonas</i>	0.00185	0.08533
<i>Cloacibacterium</i>	0.00350	0.04973
<i>Paludibacter</i>	0.00119	0.04322
<i>Proteiniclasticum</i>	0.00002	0.04096
<i>Macellibacteroides</i>	-	0.03224
<i>Microbacter</i>	0.00021	0.02923
<i>Arcobacter</i>	-	0.02374
<i>Anaerocella</i>	-	0.02280
<i>Undibacterium</i>	-	0.02075
<i>Sulfurospirillum</i>	-	0.02032
<i>Erysipelothrix</i>	-	0.02015
<i>Saccharofermentans</i>	-	0.01780
<i>Bacteroides</i>	0.00004	0.01417
<i>Geobacter</i>	0.00157	0.01040
Unculture Bacteria	0.16883	0.25144
Otus <1%	0.1932	0.2179

Tabla 8.1.5. Abundancia relativa de filos bacterianos (mayores al 1%) en muestras de agua.

OTUS	AGUA CONTAMINADA	AGUA NO CONTAMINADA
<i>Proteobacteria</i>	0.530229105	0.271613789
<i>Verrucomicrobia</i>	0.224565125	-
<i>Bacteroidetes</i>	0.167840475	0.474264179
<i>Planctomycetes</i>	0.015082732	-
<i>Acidobacteria</i>	0.014997879	0.030559368
<i>Firmicutes</i>	-	0.172910309
<i>Fusobacteria</i>	-	0.013538701
<i>Otus <1%</i>	0.026262198	0.034635315

Tabla 8.1.6. Bacterias no cultivables mayores al 1% de abundancia presentes en muestras de agua.

NO CULTIVABLES	AGUA CONTAMINADA	AGUA NO CONTAMINADA
<i>(Bacteroidetes)</i>	0.02529	-
<i>C1-B045</i>	0.02151	-
<i>GKS98 freshwater group (Alcaligenaceae)</i>	0.01294	-
<i>vadinBC27 wastewater-sludge group</i>	-	0.01753
<i>(Leptotrichiaceae)</i>	-	0.01354
<i>BSV13 - Prolixibacteraceae</i>	-	0.01251
<i>Otras</i>	0.01089	0.20785

8.2. Muestreo:



Portada de la guía para el muestreo de suelos del ministerio del ambiente. Fuente: Ministerio del Ambiente. (2013).



Fotografía de la entrada hacia la zona del derrame.



Fotografía del camino hacia la zona del derrame.

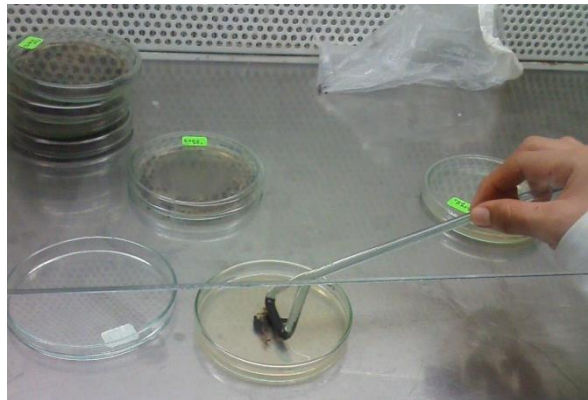


Fracos utilizados para la colección de las muestras, de capacidad 300 y 500ml.

8.3. Aislamiento de cepas bacterianas:



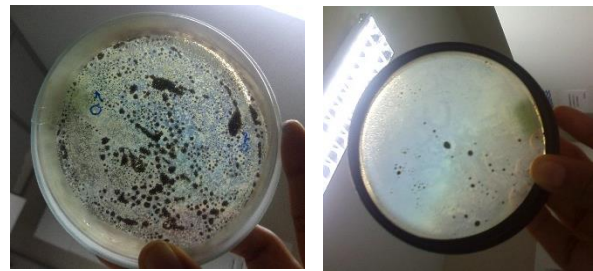
Preparación de Medio Mínimo



Extensión de petróleo crudo estéril en los medios de cultivo.



Medio de pre-enriquecimiento con muestras de suelo y agua (de izquierda a derecha).



Cepas bacterianas crecidas a partir de las diluciones del medio de pre-enriquecimiento.



Purificación de cepas bacterianas.

8.4. Genómica:



Extracción de ADN genómico y medición de la cantidad y calidad de ADN extraído en un espectrofotómetro digital de luz UV.



Extracción de ADN metagenómico.

8.5. PCR y Electroforesis:

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	Volumen Final
Agua Ultra Pura			17,7uL
Buffer	10X	1X	2,5uL
DNTPs	10mM	0.2mM	0,5uL
MgCl ₂	25mM	2mM	2uL
Forward Primer	15pmol/uL	0,36uM	0,6uL
Reverse Primer	15pmol/uL	0,36uM	0,6uL
Taq. Polimerasa	5u/uL	0,5u/uL	0,1uL
ADN molde			1uL
Volumen final			25uL

Tabla con cantidades estandarizadas por el equipo de Inca Bio´tec y utilizado en esta investigación para la PCR.



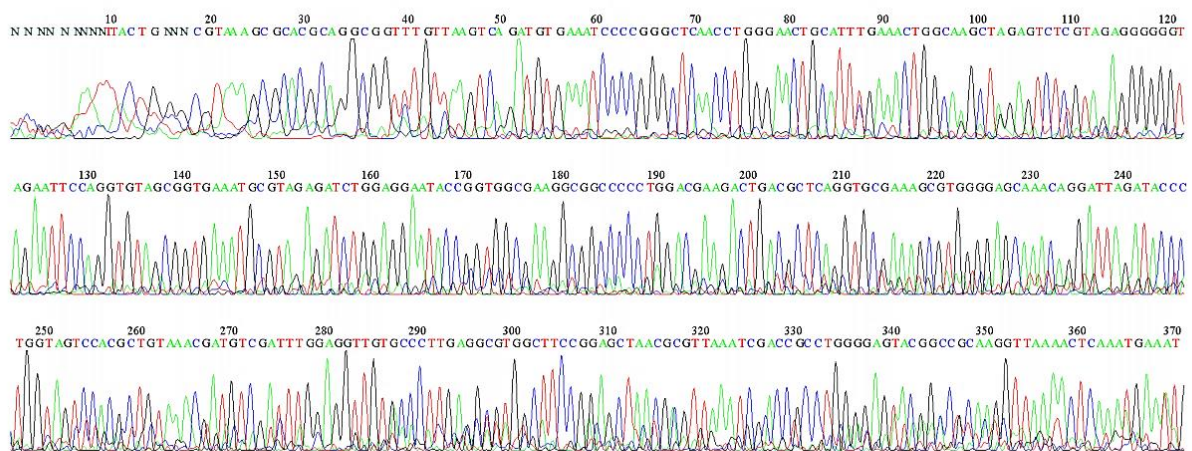
Preparación para la PCR del gen 16S ARNr.



Migración en gel de agarosa en una cámara electroforética horizontal.

8.6. Bioinformática:

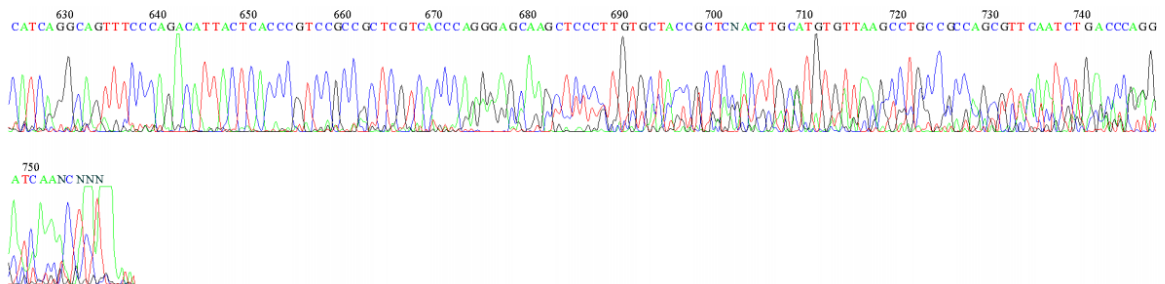
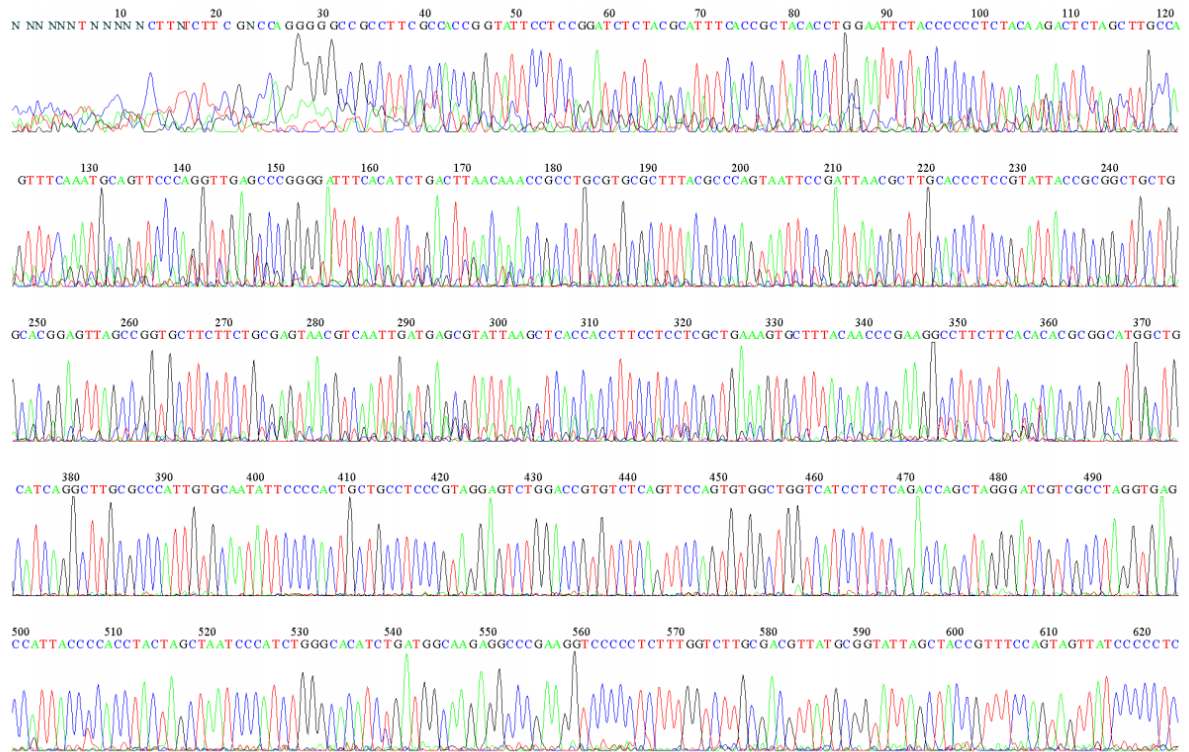
File: 285_BP2_518F.ab1 Run Ended: 2017/12/9 13:13:59 Signal G:386 A:357 C:355 T:333
Sample: 285_BP2_518F Lane: 81 Base spacing: 15.366404 373 bases in 4521 scans Page 1 of 1



GA



Electroferograma de una de las cepas a partir de la amplificación por 16S ARNr, (secuenciamiento con el primer Forwad).



Electroferograma de una de las cepas a partir de la amplificación por 16S ARNr, (secuenciación con el primer Reverse).